

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
— Fachrichtung Fleischhygiene —
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

angefertigt am
Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern
in Nürnberg

**VERSUCHE ZUR AKTUALISIERUNG DES NACHWEISES
DES ALLGEMEINEN KEIMGEHALTS,
DER SALMONELLEN UND DER CLOSTRIDIEN
IM RAHMEN DER "AMTLICHEN BAKTERIOLOGISCHEN
FLEISCHUNTERSUCHUNG" (BU)**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karl-Heinz Bogner
Tierarzt aus Holzheim/Opf.

Berlin 1985
Journal-Nr. 1229

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
— Fachrichtung Fleischhygiene —
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

angefertigt am
Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern
in Nürnberg

**VERSUCHE ZUR AKTUALISIERUNG DES NACHWEISES
DES ALLGEMEINEN KEIMGEHALTS,
DER SALMONELLEN UND DER CLOSTRIDIEN
IM RAHMEN DER "AMTLICHEN BAKTERIOLOGISCHEN
FLEISCHUNTERSUCHUNG" (BU)**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karl-Heinz Bogner
Tierarzt aus Holzheim/Opf.

Berlin 1985
Journal - Nr. 1229

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereiches Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:

Prof. Dr. F. Hörchner

Erster Gutachter:

Prof. Dr. G. Reuter

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion:

29. April 1985

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

AB.A	=	Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz
BU	=	Amtliche Bakteriologische Fleischuntersuchung nach Anlage 1 zur AB.A
S.	=	Salmonella
Cl.	=	Clostridium
PR	=	Tetrathionat-Anreicherung nach PREUSS
SC	=	Selenit-Cystin-Anreicherung
MK	=	Tetrathionat-Anreicherung nach MÜLLER-KAUFFMANN
LB	=	Leberbrühe nach KELCH
NA	=	Nähragar
DB	=	Dextrose-Blut-Agar
BPL	=	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar
ENDO	=	Fuchsin-Laktose-Agar nach ENDO
BPLS	=	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
XLD	=	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
EG	=	Europäische Gemeinschaft

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	2
1. <u>Entwicklung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung</u>	2
2. <u>Aufgabe der Bakteriologischen Fleischuntersuchung</u>	3
3. <u>Die "Amtliche Bakteriologische Fleischuntersuchung" in der Bundesrepublik Deutschland und in 14 anderen europäischen Ländern</u>	3
4. <u>Definition, Bestimmung und Beeinflussung des Keimgehaltes im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung</u>	5
4.1. Definition der spezifischen Krankheitserreger	6
4.2. Definition des "unspezifischen Keimgehaltes"	6
4.3. Die Beeinflussung des Keimgehaltes durch die Schlachthygiene, die Probenentnahme, den Transport und die Untersuchungstechnik	8
4.3.1. Die Beeinflussung des Keimgehaltes von Schlachttierkörpern durch äußere Faktoren	8
4.3.2. Die Beeinflussung des Keimgehaltes von BU-Proben durch äußere Faktoren	9
5. <u>Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Salmonellen</u>	12
5.1. Vorkommen von Salmonellen bei Tieren	13
5.1.1. Epidemiologie von Salmonellosen	13
5.1.2. Pathogenese von Salmonelleninfektionen	16

5.1.3.	Der Einfluß des Transports vom Erzeugerbetrieb zum Schlachthof auf die Ausscheidung von Salmonellen	17
5.1.4	Die Verbreitung von Salmonellen während des Schlachtvorgangs	18
5.2.	Salmonellenfunde im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung	20
5.3.	Die Bedeutung der Salmonellen aus lebensmittelhygienischer Sicht	22
5.4.	Nachweis von Salmonellen	22
5.4.1	Anreicherung von Salmonellen in flüssigen Nährböden	23
5.4.2	Kultivierung auf festen Nährböden	27
5.4.3.	Identifizierung von Salmonellen	29
5.4.4.	Amtliche Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Salmonellen	30
6.	<u>Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Clostridien</u>	33
6.1.	Vorkommen und Bedeutung von Clostridien	33
6.2.	Lebensmittelhygienische Bedeutung der Clostridien	37
6.2.1.	Clostridium perfringens	37
6.2.2.	Clostridium botulinum	38
6.2.3.	Sonstige Clostridien von lebensmittelhygienischer Bedeutung	40
6.3.	Nachweis von Clostridien	40
6.3.1.	Anaerobe Kulturverfahren	40
6.3.2.	Flüssige Nährmedien	41
6.3.3.	Subkultivierung auf festen Nährböden	43
6.3.4.	Identifizierung von Clostridien	44
6.3.5.	Toxinnachweis	46
6.3.6.	Amtliche Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Clostridien	47
7.	<u>Derzeit zur Homogenisierung von Lebensmitteln gebräuchliche Methoden</u>	48

C.	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	51
1.	<u>Material</u>	51
1.1.	Probenmaterial	51
1.2.	Material zur Aufbereitung der Proben sowie Kultivierung und Identifizierung der Keime	54
1.3.	Ergebnisse von routinemäßig durchgeführten Untersuchungen	55
2.	<u>Methodik</u>	55
2.1.	Untersuchung von 219 BU-Einsendungen auf Keimgehalt und Salmonellen (Serie 1)	56
2.1.1.	Verfahren nach Anlage 1 zur AB.A (Abb. 2)	56
2.1.2.	Verfahren mit homogenisierten Proben (Abb. 3)	57
2.2.	Vergleichende Untersuchung von 40 vorselektierten BU-Einsendungen auf Salmonellen (Serie 2)	60
2.3.	Vergleichende Untersuchung von 24 vorselektierten salmonellenhaltigen BU-Einsendungen (Serie 3)	60
2.4.	Untersuchung von 227 BU-Einsendungen auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" (Serie 4)	62
2.5.	Auswertung von Salmonellenfunden aus 61.219 BU-Einsendungen aus einer Untersuchungsstelle	63
3.	<u>Ergebnisse</u>	64
3.1.	Allgemeine Erkenntnisse	64
3.2.	Vergleich der Ergiebigkeit von Stückproben- und Homogenisatstrichen für die Quantifizierung des allgemeinen Keimgehalts bei 219 BU-Einsendungen	64
3.3.	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung auf Salmonellen	65

3.3.1. Vergleich der Salmonellenausbeute bei Stückproben nach Anlage 1 zur AB.A und bei Homogenisaten eines reduzierten Probenansatzes (Serie 1 und 2)	68
3.3.2. Vergleich der Salmonellenausbeute aus Stückproben und Homogenisaten bei gleichem Probenansatz	68
3.3.3. Vergleich der Salmonellenausbeute bei Oberflächen- und Tiefenproben	69
3.3.4. Die Bedeutung der Leberkomplexanreicherung nach Anlage 1 zur AB.A	69
3.3.5. Leistungsfähigkeit verschiedener Anreicherungsmedien	69
3.3.6. Leistungsfähigkeit verschiedener Plattierungsmedien	70
3.4. Ergebnisse der Untersuchung auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen"	71
3.4.1. Auswirkung der Probenaufbereitungsmethode und der Beimpfungstemperatur auf die Nachweisraten	71
3.4.2. Auswirkung der Beimpfungstemperatur auf das Auftreten falsch-positiver Reaktionen in der Leberbrühe	71
3.5. Erhebungen zur Ergiebigkeit der bisherigen Salmonellennachweisteknik nach AB.A im Einzugsgebiet der BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg	72
3.5.1. Stellenwert der beiden Salmonellenanreicherungen	72
3.5.2. Stellenwert der einzelnen Organe	72
3.5.3. Stellenwert des Direktausstriches	73
3.6. Erhebungen über die im Einzugsgebiet vorkommenden Salmonellenspezies (452 Salmonellenfunde aus 61.219 BU-Einsendungen an den Schlachthof Nürnberg)	73
D. <u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	83
1. <u>Allgemeine Erkenntnisse</u>	83
2. <u>Vergleich des allgemeinen Keimgehalts von BU-Proben-sätzen</u>	84
3. <u>Vergleichende Untersuchungen auf Salmonellen</u>	85

4.	<u>Vergleichende Untersuchungen auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen"</u>	92
5.	<u>Interpretation der Erhebungen aus dem routinemäßigen Nachweis von Salmonellen an einer Untersuchungsstelle</u>	96
6.	<u>Vorschläge der DVG zur Reform der BU und BU-Vorschriften aus anderen Ländern</u>	99
7.	<u>Absichten der EG zur Erfassung mikrobiologischer Schwachpunkte in der Fleischhygiene</u>	103
E.	<u>SCHLUSSFOLGERUNGEN</u>	105
F.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	107
	<u>SUMMARY</u>	111
G.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	115
	<u>ANHANG</u>	138

A. E I N L E I T U N G

Die "Amtliche Bakteriologische Fleischuntersuchung" (BU) besteht seit 1940 in nahezu unveränderter Form. Seit dieser Zeit hat sich jedoch das Krankheitsgeschehen in den Viehbeständen spürbar gewandelt. Ernst-hafte Seuchenausbrüche sind selten geworden, heute beherrschen latente Infektionen mit Zoonoseerregern das Bild, die bei der Schlacht-tier- und Fleischuntersuchung kaum zu erfassen sind. Deshalb, und weil unsere Bakteriologische Fleischuntersuchung eine der aufwendigsten in Europa ist, wurde diskutiert, ob wir sie in diesem Umfang überhaupt noch benö-tigen, wobei auch wirtschaftliche Überlegungen mit einbezogen wurden.

Auf der anderen Seite wurden die Nachweismethoden für Salmonellen und Clostridien in den letzten Jahren erheblich verbessert. Auch die Homo-genisation von Lebensmitteln zur Erfassung ihres Keimgehaltes ist heute üblich, wobei man davon auch eine Erhöhung der Salmonellen- und Clostri-diennachweisrate erwartet. Seit 1975 arbeitete eine Arbeitsgruppe der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft an einer Reform der Bak-teriologischen Fleischuntersuchung. Sie übermittelte 1983 einen Ände-rungsvorschlag an das zuständige Ministerium.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, welche Auswirkungen die Homogenisierung der Proben für die Bakteriologische Fleischuntersau-chung mit einem in der Praxis anwendbaren Verfahren auf den feststell-baren Keimgehalt, sowie auf die Nachweisbarkeit von Salmonellen, Clo-stridien und anderen Krankheitserregern im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren nach Anlage 1 zu den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbe-schaugesetz (AB.A) hat. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang die Ver-wendung von zeitgemäßen Salmonellennachweisverfahren geprüft werden, wobei zwischen Oberflächen- und Tiefenproben unterschieden werden sollte.

Die zusätzliche Auswertung von Unterlagen über Salmonellennachweise im Rahmen der routinemäßig durchgeführten BU an einer großen Untersuchungs-stelle sollte Auskunft darüber geben, in welchem Umfang Salmonellen in welchen Organen bzw. Organsystemen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Angaben sollte in etwa abgeschätzt werden, inwieweit sich eine mögliche Reduzierung des Untersuchungsaufwandes auf das Untersuchungsergebnis auswirken könnte.

8. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

1. Entwicklung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung

Die Bakteriologische Fleischuntersuchung wurde als zusätzliche Untersuchung zur pathologisch-anatomischen Beurteilung zuerst von BASENAU im Jahre 1894 vorgeschlagen und 1907 in Schleswig und 1908 in Sachsen erstmals eingeführt. Der erste preußische Ministerialerlaß, der Richtlinien für die Bakteriologische Fleischuntersuchung enthielt, stammt aus dem Jahr 1914, aber erst 1922 wurde die Untersuchung im ganzen Reichsgebiet eingeführt. 1933 wurden in einer Novelle noch nicht geregelte Punkte reichseinheitlich geklärt und seit 1940 besteht die Bakteriologische Fleischuntersuchung in nahezu unveränderter Form (BARTELS, 1968; STOLLE und REUTER, 1980 a). Die Vorschriften über die Durchführung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung sind bisher noch in Anlage 1 zu den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschau-gesetz (AB.A) festgelegt. Die Verordnungen zum Fleischbeschau-gesetz und damit auch die AB.A werden in nächster Zeit durch eine den EG-Vorschriften angepaßte Fleischhygieneverordnung ersetzt werden. Die Vorschriften über die Bakteriologische Fleischuntersuchung werden dann in der Beilage zur neuen Verordnung zu finden sein.

Schon eine von SEIDEL 1966 durchgeführte Umfrage bei Schlachthöfen und Untersuchungsämtern ergab eine Fülle von Vorschlägen zur Änderung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung. Seither gab es in der Literatur zahllose weitere Anregungen, die Probeentnahmetechnik, den Versand und die Untersuchungsmethodik zu verbessern, bzw. an den neuesten wissenschaftlichen Kenntnisstand anzugleichen (STOLLE und REUTER, 1980 a). 1975 konstituierte sich eine Arbeitsgruppe "Mikrobiologische Fleischuntersuchung" des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, die 1983 einen Vorschlag für eine Neufassung der Methodik der Bakteriologischen Fleischuntersuchung nach Anlage 1 zu § 20 der AB.Ä vorlegte.

2. Aufgabe der Bakteriologischen Fleischuntersuchung

Nach Anlage 1 zur AB.A zum Fleischbeschaugesetz sind die zur Bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandten Proben (Muskulatur aus je einem Vorder- und Hinterviertel, Lymphknoten aus je einem Vorder- und Hinterviertel, Milz, Niere, Leber, Leberlymphknoten und Galle, sowie im Verdachtsfall andere veränderte Teile) auf das Vorhandensein von Fleischvergiftungserregern, anderen Krankheitserregern, insbesondere Milzbrandbazillen und Rotlaufbakterien und von saprophytären Keimen zu untersuchen. Daneben muß die Muskulatur auf das Vorhandensein von Clostridien untersucht werden.

3. Die "Amtliche Bakteriologische Fleischuntersuchung" in der Bundesrepublik Deutschland und in 14 anderen europäischen Ländern

STOLLE und REUTER (1980 a) verglichen unsere Vorschriften über die Bakteriologische Fleischuntersuchung mit denen aus 14 anderen europäischen Ländern (Belgien, Dänemark, Deutsche Demokratische Republik, Frankreich, Großbritannien, Irland, Island, Israel, Niederlande, Norwegen, Österreich, Rumänien, Schweden und Schweiz). Demnach werden in den Vorschriften der Schweiz, Österreichs, Israels, Islands und Dänemarks keine Gründe für die Einleitung einer Bakteriologischen Fleischuntersuchung gegeben, in Großbritannien, Irland und Belgien liegt die Einleitung im Ermessen des Fleischbeschauers bzw. des Tierarztes, wogegen in allen anderen Ländern verbindliche Vorschriften bestehen. Wie bei uns müssen in Österreich, in Dänemark und Island Muskulatur, Körperlymphknoten, Milz, Niere, Leber, Leberlymphknoten und Galle untersucht werden, dagegen in Frankreich nur die Muskulatur und in den Niederlanden nur die Milz. In der DDR wird im Vergleich zu uns auf die Untersuchung von Muskulatur und Körperlymphknoten verzichtet, in Israel auf Muskulatur und Leberlymphknoten, in Schweden auf Leberlymphknoten und Niere und in Norwegen sogar auf Milz und Niere. Die Vorschriften über die Entnahme zusätzlicher Proben in Verdachtsfällen gleichen sich in etwa.

Zum Transport der Proben enthalten die Vorschriften in Belgien, Großbritannien, Irland, Island und Norwegen keine Angaben. Alle übrigen Länder schreiben wie wir Vorkühlung, Einzelverpackung in undurchlässi-

gem Material und Schnelltransport der Proben vor, Frankreich zusätzlich ein Abflammen der Probeentnahmestelle und Schweden ein Abflammen der Probe vor dem Transport. Außer bei uns wird in Frankreich und in den Niederlanden ein Isolierbehälter mit Kühlelementen sowie in der DDR die Beipackung von aufsaugender Zusatzverpackung gefordert.

Für den Direktausstrich des Probenmaterials werden bei uns und in der DDR Nähragarplatten (NA), in Frankreich Nähragar-, Schrägagar- und Nährbouillon-Röhrchen, in Schweden Glukose-Agar und in den Niederlanden Trypton-Soja-Bouillon verwendet. An Blutplatten wird in der Schweiz, in Norwegen, Schweden, Dänemark und Island Blutagar eingesetzt, bei uns (allerdings nur im Verdachtsfall) und in Österreich Dextrose-Blutagar (DB) und in den Niederlanden Trypton-Soja-Rinderblutagar.

Zum Salmonellennachweis ist bei uns die Verwendung von Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar (BPL) und einer Platte freier Wahl vorgeschrieben, in Dänemark und Island Bromthymolblau-Laktose-Saccharose-Agar, in der DDR GASSNER-Agar und Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS), in Frankreich Brillantgrün-Agar und eine weitere Platte nach Wahl sowie Leber-Galle-Brillantgrün-Bouillon, in Schweden DRIGALSKI-Agar oder Bromkresolpurpur-Laktose-Agar, sowie in Österreich und in der Schweiz Platten nach freier Wahl.

Interessanterweise wird in Frankreich, wo nur die Muskulatur untersucht wird, zur Anzüchtung ein Homogenisat verwendet.

Für die Salmonellenanreicherung besteht bei uns, in Norwegen, Österreich und Island die Auswahl zwischen Tetrathionat- und Selenit-Anreicherung, dagegen ist in der DDR und in der Schweiz, sowie in Schweden und Dänemark eine Tetrathionatanreicherung und in Frankreich eine Selenitanreicherung vorgeschrieben. Für das Überimpfen der Anreicherung wird in 6 Ländern BPL verwendet, in Dänemark alleine, in der DDR zusammen mit GASSNER-Agar und BPLS, in Norwegen nur zusammen mit letzterem, bei uns, in Frankreich und in der Schweiz zusammen mit einer zweiten Buntplatte nach Wahl. In Schweden wird dagegen auf GASSNER- und Desoxycholat-Citrat-Agar überimpft und in Island auf BPLS, dagegen hat in Österreich der Untersucher auch hier freie Plattenwahl.

Zum Nachweis von Clostridien ist in der DDR, in Norwegen, Dänemark und Island die Verwendung von sulfitreduzierenden Medien vorgeschrieben, in der Schweiz ein Thioglykolat-Medium und eine Blutplatte, in Schweden nur eine Blutplatte, bei uns eine Leberbrühe (LB). In Österreich stehen LB, Traubenzucker-Hochschoicht-Agar und Thioglykolatmedium und in Frankreich Trypton-Sulfit-Neomycin-Medium und Sulfit-Polymyxin-Sulfadiazin-Medium zur Wahl. Bei uns, in Schweden und in der Schweiz muß auch eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, daß die Bakteriologische Fleischuntersuchung in der Bundesrepublik Deutschland in jeder Beziehung zu den aufwendigsten in den besprochenen Ländern zählt.

4. Definition, Bestimmung und Beeinflussung des Keimgehaltes im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung

Beim Fleisch werden aufgrund der festen Gewebsstruktur zwei verschiedene mikrobielle Biotope unterschieden, die Tiefenflora und die Oberflächenflora. Die Tiefenflora entsteht durch das Eindringen von Keimen aus den Blut- und Lymphgefäßen in die Tiefe der physiologisch keimfreien Gewebe, entweder intra vitam oder in der Agonie. Sie ist in der Regel mengenmäßig gering und vermehrt sich nur langsam. Die Oberflächenflora entsteht dagegen durch Kontamination während der Schlachtung aus der Umgebungsflorea von Mensch und Tier. Sie kann sich schnell entwickeln und quantitativ hohe Werte erreichen. Während der Lagerung kann sich noch durch Eindringen von Oberflächenkeimen in die Tiefe die sogenannte Penetrationsflora entwickeln (REUTER, 1984).

Die Probenentnahme- und Untersuchungsvorschriften im Rahmen der AB.A haben eindeutig die Erfassung der Tiefenflora zum Ziel, wobei die Oberflächenflora und die transportbedingte Penetrationsflora ausgeschaltet werden soll.

4.1. Definition der spezifischen Krankheitserreger

Neben der Untersuchung auf Fleischvergifter, d. h. Salmonellen, und Clostridien, die in späteren Kapiteln gesondert besprochen wird, müssen die Proben im Plattenausstrichverfahren auf mindestens je einer halben NA- und BPL-Platte, einer weiteren Buntplatte sowie im Verdachtsfall einer DB-Platte auf das Vorhandensein von Krankheitserregern untersucht werden. Dabei sind nur Milzbrandbazillen und Rotlaufbakterien als Erreger speziell genannt, wobei bei Milzbrandverdacht als zusätzliche Untersuchung ein nach GIEMSA gefärbter Ausstrich und die Schichtprobe nach ASCOLI sowie evtl. ein Tierversuch vorgeschrieben ist. Da die Feststellung von Listeriose zur Untauglichkeit des Tierkörpers führt, müssen auch deren Erreger zu den spezifischen Krankheitserregern gezählt werden.

Bei der bakteriologischen Diagnostik des nur selten auftretenden Milzbrandes treten auch bei undeutlichen pathologischen Symptomen keine Schwierigkeiten auf (KLIMA, 1972). Für den Nachweis von Listerien wird jedoch die Untersuchungsmethodik von einigen Autoren als nicht befriedigend angesehen (OBIGER und SCHÖNBERG, 1973; BENTLER, 1977), ähnliches gilt für die Rotlaufdiagnostik (ZIMMERMANN, 1963; BÖHM, 1971; BENTLER, 1977).

4.2. Definition des "unspezifischen Keimgehaltes"

Neben der Identifizierung der spezifischen Krankheitserreger soll im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung nach Anlage 1 zur AB.A festgestellt werden, ob im Tierkörper zum Zeitpunkt der Schlachtung eine mehr oder weniger starke Überschwemmung der Blutbahn mit Bakterien vorlag, oder ob der Tierkörper schwach keimhaltig oder keimfrei war, wobei der "unspezifische Keimgehalt" getrennt nach Organen und Muskulatur mitgeteilt werden muß.

Der Begriff "unspezifischer Keimgehalt" ist seit Jahren Gegenstand zahlreicher Diskussionen, da er nicht definiert ist. Er umfaßt die schnell und einfach kultivierbaren Keimgruppen der Enterobacteriaceae (mit Aus-

nahme der Salmonellen), Micrococcaceae, Streptococcaceae, Corynebakterien, Bazillen, Pseudomonaden, Aeromonaden sowie mögliche andere Keime (MARX und REUTER, 1974 a, b; GULISTANI, 1972; BENTLER, 1978).

Viele Autoren übten an diesem Begriff Kritik, da er auch menschenpathogene Keimarten, wie z. B. Corynebakterien, Pasteurellen, Staphylokokken umfaßt (PÄHR, 1963; SCHOENE, 1965; SEIDEL, 1966; NARUCKA und WESTENDORP, 1972; TOEPFER, 1973). Neuere Arbeiten von WEISSER (1979; 1980) über das Vorkommen und die Differenzierung von Streptokokken bei Kälbern, Rindern und Schweinen im Rahmen der BU haben gezeigt, daß neben saprophytären Arten auch relativ häufig menschen- und tierpathogene Spezies vorkommen. Auch *Yersinia enterocolitica* kommt bei Schlachttieren vor, dürfte aber im Rahmen der BU kaum zu erfassen sein (STENGEL, 1983). Auch Brucellen und Hämophilusarten sind mit der derzeit üblichen Methodik nicht nachzuweisen (SCHOENE, 1965), dasselbe gilt für Leptospiren (GROSSKLAUS, 1968) und *Campylobacter fetus*, subsp. *jejuni* (GILL und HARRIS, 1982).

Die Quantifizierung des Keimgehaltes ist nicht definiert, wie z. B. in den Niederlanden, wo ab 10 Kolonien die Blutplatte als "positiv" bewertet wird oder in Frankreich, wo der Keimgehalt pro Gramm Muskulatur angegeben werden muß (STOLLE und REUTER, 1980 a). Die Aussagefähigkeit des "unspezifischen Keimgehaltes" wurde häufig in Frage gestellt, da Oberflächenkontaminationen und Keimpenetration zu einem falschen Ergebnis führen können.

BENTLER (1977) vertrat die Ansicht, daß das Verfahren zur Ermittlung des "unspezifischen Keimgehaltes" ein "nach mikrobiologischen Kriterien fehlerhaftes Verfahren ist, das weder eine exakte Beurteilung des fleischhygienischen Status einer Tierkörpers noch eine Aussage über seine technologische Verwendbarkeit zuläßt". Er hält eine mikrobielle Statuserhebung nur dann für sinnvoll, wenn statt einer Gesamtkeimzahl eine Übersicht über hygienisch interessante Keimgruppen angegeben würde. In diesem Zusammenhang sollte auch angemerkt werden, daß in Frankreich der Nachweis von Pasteurellen, *Corynebacterium pyogenes*, hämolysierenden Streptokokken und Staphylokokken zur Untauglicherklärung des Tierkörpers führt (STOLLE und REUTER, 1980 a).

4.3. Die Beeinflussung des Keimgehaltes durch die Schlachthygiene, die Probenentnahme, den Transport und die Untersuchungstechnik

Wenn anzunehmen ist, daß ein starker Keimgehalt in BU-Proben auf eine Verunreinigung oder Anreicherung zurückzuführen ist. (z. B. Einfluß der Witterung, Beförderungsart und -dauer, etc.) so ist der Einsender laut Anlage 1 zur AB.A darauf hinzuweisen. Es gibt sehr viele Faktoren, die den Keimgehalt der Proben beeinflussen, und es ist nur sinnvoll, den "echten, unspezifischen Keimgehalt" zu ermitteln (MARX und Reuter, 1974 a; STOLLE und REUTER, 1980 a), da nur dieser Rückschlüsse auf den Tierkörper zuläßt.

4.3.1. Die Beeinflussung des Keimgehaltes von Schlachttierkörpern durch äußere Faktoren

Der Tiefenkeimgehalt von Schlachttierkörpern kann, wie aus den Ausführungen über Salmonellen und Clostridien zu ersehen ist, durch den Transport und den damit verbunden Streß beeinflußt werden.

Für die Höhe des Oberflächenkeimgehaltes ist die Schlachthygiene von Bedeutung. So verglich GULISTANI (1972) den Keimgehalt auf routinemäßig geschlachteten Rinderhälften mit dem auf unter experimentellen Bedingungen geschlachteten. Dabei wurden bei den ersteren in 70 % der Fälle E.coli nachgewiesen, sowie im Durchschnitt $10^{3,5}$ Enterobakteriazeen und $10^{5,9}$ psychrotrophe gramnegative Keime/100 cm² Oberfläche, während bei den letzteren nur in 40 % der Fälle E.coli nachgewiesen wurden, sowie im Durchschnitt nur $10^{1,7}$ Enterobakteriazeen und 10^4 psychrotrophe gramnegative Keime/100 cm². Außerdem war die Artenvielfalt der Keime auf den experimentell geschlachteten Tierkörpern geringer. BALTZER und WILSON (1965) fanden nach dem Brühen auf der Haut von Schweinen in Schlächtereien mit guten hygienischen Voraussetzungen häufig mehr als 70.000 aerobe Keime/10 cm², nach dem Abschaben waren es weniger, aber erst durch das Abspritzen der Tierkörper mit heißem Wasser (95° - 98° C) für 10 - 15 Sekunden unmittelbar vor dem Kühlen wurde der Keimgehalt erheblich auf ca. 220 - 3.500/10 cm² reduziert.

Nach SNIJDERS et al. (1984) kann der Gesamtkeimgehalt und der Gehalt an Enterobakteriaceen auf der Oberfläche von Schlachtschweinen z. B. durch die Chlorierung des Wassers in den Putz- und Poliermaschinen, durch Hitzebehandlung des Tierkörpers nach dem Polieren in einem Infrarottunnel und durch hygienische Maßnahmen während des Eviszerierens zum Teil erheblich reduziert werden. Sie faßten die vor und während der Schlachtung zu treffenden hygienischen Maßnahmen, durch die die mikrobielle Kontamination des Fleisches so gering wie möglich gehalten werden soll, unter dem Begriff "GOOD MANUFACTURING PRACTICES" (GMP) zusammen. Diese beinhalten hygienische Maßnahmen beim Transport, getrennte Schlachtung von gesunden und kranken Tieren, strikte Aufteilung des Schlachtvorgangs nach hygienischen Gesichtspunkten in drei Teile, nämlich Warte- und Betäubungsraum, unreinen und reinen Teil, gute Kühlung und Aufrechterhaltung der Kühlkette, optimale Reinigung und Desinfektion einschließlich deren Überprüfung, gute Hygieneausbildung des Schlachtpersonals sowie laufende bakteriologische Überprüfung der Schlachthygiene an den kritischen Punkten.

4.3.2. Die Beeinflussung des Keimgehaltes von BU-Proben durch äußere Faktoren

Der bei der Bakteriologischen Fleischuntersuchung festgestellte Keimgehalt hängt in erster Linie von der Kontamination mit Oberflächenkeimen, d. h., von der Art und Sorgfalt der Probenentnahme ab (SCHÖNE, 1965; KLEIN und DITGENS, 1966; SEIDEL, 1966; MARX und REUTER, 1974 a; BENTLER, 1977; BENTLER 1978).

Zwar ist in der AB.A die Verwendung von sterilen Instrumenten bei der Probenentnahme vorgeschrieben, dieses wird aber in der Praxis häufig nicht genügend beachtet (PÄHR, 1963; HABISREITINGER, 1973; MARX und REUTER, 1974 b). Eine weitgehend sterile Probenentnahme würde auch die Verwendung eines Abflamngerätes oder Alkohol erfordern. MARX (1976) stellte fest, daß die Entnahme von Gallenflüssigkeit mit Hilfe einer Einmalspritze insbesondere nach vorherigem Abflammen der Gallenblase selbst bei 48-stündiger nachfolgender Lagerung zu einer erheblichen Reduzierung des Keimgehaltes führt.

Es ist sehr wichtig, daß Muskelproben in der vorgeschriebenen Größe und von Faszien umschlossen entnommen werden, um einer Keimausbreitung

während des Transportes vorzubeugen (TOEPFER, 1973; MARX und REUTER, 1974 b). Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um insbesondere Muskelproben möglichst ohne Kontamination durch Oberflächenkeime zu gewinnen. So entwickelte SCHULER (1974) eine wiederverwendbare, auto-klavierbare Fleischharpune. REUTER et al. (1977) stellten eine Einweg-Fleischharpune vor, die auch SCHULER (1979) erfolgreich einsetzte. Durch den Einsatz dieser Geräte konnten nach vorherigem Abflammen der Oberfläche die Proben steril entnommen werden, ohne daß die Muskulatur optisch nennenswert beeinträchtigt wurde. Der Keimgehalt der so entnommenen Muskel- und Organproben lag auch nach längerem Transport ohne Kühlung erheblich unter dem von parallel dazu mit dem Messer entnommenen Proben.

Die Proben müssen auch in der richtigen Reihenfolge entnommen werden, um nicht die Keime von üblicherweise stärker keimhaltigen Proben, z. B. der Leber, auf keimärmere, z. B. Muskulatur, zu verschleppen (TOEPFER, 1973). Nachdem er mehrmals in gleichzeitig angesetzten BU-Proben dieselbe Salmonellenspezies gefunden hatte, stellte FORSCHNER (1963) bei seinen Untersuchungen fest, daß gleichzeitig entnommene und eingesandte Proben oberflächlich mit Salmonellen kontaminiert sein können, die nach entsprechender Lagerung auch in der Tiefe nachweisbar sind.

Personenbedingte Unterschiede bei der Sorgfalt der Probenentnahme wurden von KLEIN und DITGENS (1966) beschrieben. Demnach waren durch Amtstierärzte entnommene Proben in einem Kreis wesentlich häufiger keimfrei als die durch Schlachthoftierärzte entnommenen, während die von Fleischbeschautierärzten entnommenen noch etwas seltener keimfrei waren.

Einen wesentlichen Einfluß auf den Keimgehalt der Proben hat auch die Dauer des Transports und die Probentemperatur vor und während des Transports. Verschiedene Autoren (KLEIN und DITGENS, 1966; TOEPFER, 1973; MARX und REUTER, 1974 a, b) stellten bei der Auswertung von BU-Unterlagen eine eindeutige Abhängigkeit der Anzahl der Proben mit hohem Keimgehalt von der Jahreszeit fest. Während in den Wintermonaten der Keimgehalt der Proben gering(er) ist, steigt er im Mai an und bleibt während des Sommers höher. KLEIN und DITGENS (1966) werteten meteorologische Unterlagen aus und kamen zu dem Ergebnis, daß es bei einem

Überschreiten der nächtlichen Minimaltemperaturen von 3° - 4° C zu einem sprunghaften Anstieg der stark keimhaltigen Proben und zu einer Verringerung der keimfreien Proben kam. SEIDEL und KIND (1965) kamen aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, daß im Winter eine Transportdauer von 12 oder 20 Stunden kaum Einfluß auf den Keimgehalt hat, während im Sommer nach 12 Stunden Transportzeit der festgestellte Keimgehalt als zweifelhaft und nach 20 Stunden sogar als unreal zu betrachten ist. KLEIN und HÖRTER (1973) untersuchten Muskelproben von Rindern und Schweinen unmittelbar nach der Schlachtung, sowie nach 18 Stunden Lagerung bei Kühlschranktemperatur und bei Zimmertemperatur. Während die Lagerung bei Kühlschranktemperatur den Keimgehalt kaum beeinflusste, waren 48,3 % der ursprünglich und nach kühler Lagerung keimfreien Proben nach warmer Lagerung stark keimhaltig. Auch PÄHR (1963) stellte nach ein und zwei Tagen Lagerung von BU-Proben bei 15° bis 18° C einen starken Anstieg des Keimgehaltes und der Keimvielfalt im Vergleich zu sofort angelegten Proben fest.

Untersuchungen über die Penetrationsfähigkeit von Mikroorganismen im Fleisch durch ELMOSSALAMI und WASSEF (1971) zeigten, daß *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* und *Streptococcus pyogenes* in intaktes Fleisch bei 30° C in 24 Stunden 2 - 3 mal so schnell penetrieren wie bei 7° C. BENTLER (1977) konnte ein starkes Penetrationsvermögen von Salmonellen bei 4° C und 20° C bestätigen, stellte aber bei *Clostridium sporogenes* bei 20° C ein kaum nennenswertes Wachstum und Penetrationsvermögen fest.

Aus den oben genannten Gründen empfehlen PÄHR (1963) sowie MARX und REUTER (1974 b) eine Durchkühlung der Proben vor dem Versand. SAUER und BERG (1974) schlugen die Beipackung von "Eisbomben" (tiefgefrorene, wassergefüllte Luftballons) zu den BU-Proben vor. Auch BOGEN und FORSCHNER (1974), FORSCHNER (1975) sowie BERT und KLIMA (1979) demonstrierten, daß man durch den Versand von vorgekühlten BU-Proben in wärmeisolierten Behältnissen mit bzw. ohne Beipackung von handelsüblichen Kühlelementen auch bei hohen Außentemperaturen einen übermäßigen Temperaturanstieg vermeiden kann.

Bezüglich des Anzüchtens der eingesandten Proben forderte TDEPFER (1973), daß dies nur von geschultem Personal durchgeführt werden soll, da bakteriologisches Denken nicht ohne weiteres selbstverständlich sei.

MARX und REUTER (1976) stellten fest, daß bei der Anzüchtung von Mandibularlymphknoten von Schweinen das Eintauchen in Alkohol mit anschließendem Abflammen die Oberflächenkeime selbst bei frischen Proben nur reduzieren kann, während nach 24 Stunden Lagerung bei 20° bis 22° C auch dadurch kaum mehr eine Reduzierung möglich ist, weil die Oberflächenkeime weitgehend ins Innere eingedrungen sind.

Betrachtet man alle diese, den Keimgehalt von BU-Proben beeinflussenden Faktoren, so ist es nicht verwunderlich, daß PÄHR (1963) und KLEIN und DITGENS (1966) bei der Entnahme und Untersuchung von Zweitproben aus den ausgekühlten Tierkörpern nach 2 - 3 Tagen mehrfach feststellen mußten, daß diese keimfrei waren, obwohl die vorangegangene BU einen starken Keimgehalt ergeben hatte.

5. Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Salmonellen

Die Bakteriengattung *Salmonella* wird der Familie der Enterobakteriaceen zugeordnet (COWAN, 1974). Salmonellen können bei Mensch und Tier Gastroenteritiden oder septikämische Erkrankungen hervorrufen. Daneben gibt es latent infizierte Träger, die ohne klinisch oder pathologisch erkennbare Anzeichen den Erreger beherbergen und ausscheiden und dadurch ihre Umgebung gefährden.

Die Gattung *Salmonella* wurde bisher anhand von biochemischen und ergänzenden serologischen Merkmalen in 4 Subgenera eingeteilt. Nach der Art ihrer O (Körper)- und H (Geißel)-Antigene wurden nach dem KAUFFMANN-WHITE-Schema serologisch verschiedene Spezies sowie serologische oder biochemische Varianten davon unterschieden (PIETZSCH, 1981). 1956 waren erst 468 *Salmonella*-Spezies bekannt, wozu jährlich ca. 50 neue kamen. Am 31.12.1980 betrug die Zahl bereits 2023 (KELTERBORN, 1981). Aufgrund neuerer genetischer Untersuchungen müssen jedoch alle Salmonellenstämme als eine Spezies angesehen werden, die sich mit Hilfe genetischer, bio-

chemischer und zum Teil serologischer Methoden in 6 Subspezies einteilen läßt. Die Benennung erfolgt in Zukunft nach dem neuesten, etwas vereinfachten KAUFFMANN-WHITE-Schema, wobei nur noch die Serovare der Subspezies I (früher Spezies des Subgenus I) namentlich benannt werden. Alle übrigen Serovare werden nur noch mit der Nummer der Subspezies und ihrer Antigenformel bezeichnet (BOCKEMÜHL und SEELIGER, 1985).

5.1. Vorkommen von Salmonellen bei Tieren

In der Bundesrepublik Deutschland einschließlich West-Berlin wurden laut PIETZSCH (1982) zwischen 1961 und 1981 der Zentralstelle für Veterinärmedizinische Salmonelloseforschung am Bundesgesundheitsamt von den Untersuchungsstellen 199.230 Salmonellenisolierungen gemeldet, davon waren 47,49 % *S. typhi-murium* einschließlich var. *copenhagen* und 21,48 % *S. dublin*, gefolgt von *S. infantis* (2,64 %) und *S. enteritidis* (2,34 %). 16 weitere Arten lagen zwischen 1,94 % (*S. gallinarum-pullorum*) und 0,47 % (*S. newport* und *S. bredeney*). Insgesamt wurden 74.835 Salmonellenisolierungen bei Rind, Kalb, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege im Rahmen von Bakteriologischen Fleischuntersuchungen und diagnostischen Untersuchungen kranker und verendeter Tiere registriert.

5.1.1. Epidemiologie von Salmonellen

Die Erreger tierspezifischer Salmonella-Infektionen, wie *S. cholerae-suis*, *S. abortus-equi*, *S. abortus-ovis*, *S. gallinarum-pullorum* und die meisten bei wildlebenden Vögeln gefundenen Salmonellen einschließlich *S. typhi-murium* var. *copenhagen* bei Tauben, werden nur selten auf andere Tierarten oder den Menschen übertragen.

Im Gegensatz dazu stehen bei den landwirtschaftlichen Nutztieren Salmonelleninfektionen im Vordergrund, die auch auf andere Tierarten und auf den Menschen übertragen werden können. Da sich nur ein geringer Teil dieser Infektionen klinisch manifestiert und dadurch erkannt wird, der Großteil aber latent und unerkannt bleibt, wobei der Erreger häufig ausgeschieden wird, stellt letztere Gruppe eine große Gefahr für andere Tiere und den Menschen als Konsument infizierten oder kontaminierten Fleisches dar.

Klinisch manifestierte Infektionen treten hauptsächlich bei Jungtieren auf. Dabei stehen die *S. typhi-murium*-Infektionen der Kälber im Vordergrund. Wenn diese die Erkrankung überstehen, scheiden sie den Erreger meist höchstens drei Monate lang aus. Infektionen mit *S. dublin* findet man dagegen hauptsächlich bei erwachsenen Rindern, weniger bei Kälbern und wesentlich seltener bei Schweinen. Sie treten meist in den Weidegebieten der Niederungen in Norddeutschland auf, die häufig überschwemmt werden. Erwachsene Rinder sind meist latent infiziert und scheiden den Erreger, insbesondere wenn das Leber-Galle-System betroffen ist, über einen langen Zeitraum hinweg aus (PIETZSCH, 1981).

Die Verteilung der am häufigsten nachgewiesenen Salmonellenspezies, nämlich *S. typhi-murium* und *S. dublin* auf landwirtschaftliche Nutztiere und Futtermittel tierischer Herkunft aufgrund der zwischen 1961 und 1981 bei der Zentralstelle für Veterinärmedizinische Salmonelloseforschung eingegangenen Meldungen ist in Tab. 1 dargestellt.

Neben der direkten Übertragung von Salmonellen von Tier zu Tier oder auch von Mensch zu Tier, sowie über Gerätschaften, spielen Futtermittel eine große Rolle. Dazu zählen sowohl Futtermittel tierischer Herkunft, wie Fischmehl, Fleischmehl, Blutmehl und Tierkörpermehl, als auch solche pflanzlicher Herkunft, wie Preßrückstände ölhaltiger Pflanzen, Baumwollsaat und Sojaschrot, die heute als Bestandteile von Mischfuttermitteln verwendet werden. Beispiele dafür sind *S. agona*, 1968/69 über peruanisches Fischmehl eingeführt oder eine monophasische Variante von *S. dublin*, eingeführt über südafrikanisches Fischmehl (PIETZSCH, 1981).

Betriebseigenes Futter kann auch eine Infektionsquelle darstellen. Besonders in Niederungsgebieten mit häufigen Überschwemmungen ist die Gefahr der Kontamination von Weidegras und anderen pflanzlichen Futtermitteln durch Abwässer, insbesondere solchen aus Schlachthöfen, sehr groß. Ebenso kann zur Düngung verwendeter Klärschlamm sowie Mist und Jauche kontaminiert sein. Hauptsächlich mit *S. dublin* infizierte Rinder stellen als Ausscheider in Weidegebieten eine Infektionsquelle für andere Rinder dar, denn Salmonellen sind im Kot bis zu 3 Jahren überlebensfähig. Wildlebende Vögel, Insekten und Nagetiere können ebenfalls nachweislich Überträger von Salmonellen sein (PIETZSCH, 1981).

Tab. 1: Prozentuale Verteilung der Funde an *S. typhi-murium* und *S. dublin* zwischen 1961 und 1981 in der Bundesrepublik Deutschland auf bestimmte Untersuchungsmaterialien (nach PIETZSCH, 1982)

	Bakt. Fleischuntersuchung + Sektionsmaterial + diagnostische Untersuchungen			Kotprobenuntersuchungen nach Rindersalmonellose-VD	Futtermittel tierischer Herkunft
<u><i>S. typhi-murium</i></u>	Rind	Kalb	Schwein	Rind + Kalb	
n	7.452	10.694	13.712	26.372	269
%					
aus diesem Untersuchungsmaterial	32,35%	44,85%	57,25%	57,61%	4,09%
 <u><i>S. dublin</i></u>					
n	11.437	11.058	2.351	16.866	48
%					
aus diesem Untersuchungsmaterial	49,65%	33,67%	9,82%	36,84%	0,73%

5.1.2. Pathogenese von Salmonelleninfektionen

Nach PIETZSCH (1981) entwickeln sich Salmonelloseerkrankungen wahrscheinlich in der Art, daß von den oral aufgenommenen Erregern im Darm die toxischen Komponenten (Enterotoxine, vaskulärer Permeabilitätsfaktor) freigesetzt und durch Blut und Lymphe resorbiert werden, wodurch es zu Fieber, Durchfall und eventuell Kreislaufkomplikationen kommt. Liegt eine ausreichende Zahl lebender Salmonellen vor, so vermehren sich diese im Dünndarm und dringen durch die geschädigte Darmwand auf dem Blut- und Lymphweg weiter in den Organismus vor. Sie gelangen über die Pfortader in die Leber, von dort über die Gallengänge in die Gallenblase, wo sie (insbesondere *S. dublin* beim Rind) lange persistieren und meist in periodischen Abständen über den Kot ausgeschieden werden können. Dringen sie weiter vor, so können sie noch Milz, Niere und Körperlymphknoten besiedeln, sowie weibliche Geschlechtsorgane, das Euter und hauptsächlich bei Kälbern auch Gelenke, den Nabel sowie Lunge und Pleura. Tierartsspezifische Salmonellen werden bevorzugt in bestimmten Organen gefunden, z. B. *S. abortus-ovis* in der Gebärmutter und *S. pullorum-gallinarum* im Eierstock von Hühnern. Bei latent infizierten Tieren werden meist nur geringe Keimengen in den Organen und im Kot gefunden.

Pathologische Veränderungen fehlen bei perakutem Verlauf, außer einer katarrhalischen Enteritis, meist. Die septikämische akute Verlaufsform führt zur Entzündung und Degeneration parenchymatöser Organe sowie Petechien auf den Serosen, in der Nierenrinde und in der Harnblase. Die katarrhalische Enteritis kann in eine hämorrhagische oder nekrotisierende übergehen. Bei der subakuten oder chronischen Verlaufsform findet man hyperplastische Milzschwellungen mit Nekrosen und anämischen Infarkten, sowie Nekrosen in Leber, Nieren, Lunge und Knochenmark, fettige Leberdegeneration und Gallenblasenentzündung. Neben unspezifischen Nekroseherden werden auch spezifische Granulome, sogenannte Paratyphusknötchen gebildet. Außer diesen Veränderungen findet man auch Gastroenteritiden mit Schwellung der Mesenteriallymphknoten, Pericarditis, Myocarditis, katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie und Lungenödem, Schwellung von Gelenken und Sehnenscheiden, sowie seröse und fibrinöse Exsudate in Brust- und Bauchhöhle und vereinzelt Meningitis.

5.1.3. Der Einfluß des Transports vom Erzeugerbetrieb zum Schlachthof auf die Ausscheidung von Salmonellen

Da Salmonelloseinfektionen wie verschiedene andere Zoonosen sehr häufig in latenter Form vorliegen, die weder klinisch bei der Schlacht tierbe-schau, noch pathologisch-anatomisch nach der Schlachtung zu erkennen sind, forderte z. B. GROSSKLAUS (1968) schon vor einigen Jahren die Vorverlegung der Schlacht tieruntersuchung in die Erzeugerbetrie-be rechtzeitig vor dem Abtransport. Verschiedene Untersuchungen haben je-doch ergeben, daß in den Ursprungsbetrieben Salmonellen wesentlich seltener nachgewiesen werden konnten als nach dem Transport, d. h., daß offensichtlich erst der Transportstreß eine vermehrte Ausschei-dung bei Salmonellenträgern bewirkt.

McCAUGHEY et al. (1971) untersuchten in Irland Kotproben von 1.108 Schlachtrindern nach kurzem Transport zum Schlacht- bzw. Viehhof auf S. dublin und fanden 0,72 % positiv. Dagegen waren von 1.091 Rindern, die einen längeren Transport hinter sich hatten, 2,65 % positiv. STOLLE und REUTER (1978 a, b) untersuchten die Kotproben von Rindern 6 - 15 Tage vor der Schlachtung und konnten in keinem Fall Salmonellen nach-weisen. Im Schlachthof erwiesen sich jedoch 17 von 242 Tieren (7 %) dieses Kollektivs als salmonellen-positiv.

Bei Schlachtschweinen im Erzeugerbetrieb fanden STOLLE und REUTER (1974) in 82 Sammelkotproben von 494 Schweinen in keinem Fall Salmonellen. Bei der Untersuchung von 79 Proben von 462 Schweinen nach dem Transport zum Schlachthof konnte in 3 Kotproben aus einer Gruppe von 21 Schweinen aus einem Betrieb S. infantis nachgewiesen werden. Auch OOSTEROM et al. (1982) untersuchten bei Schweinen die Transportfahrzeuge, den Schlacht-bereich, sowie die Faeces und die Mesenteriallymphknoten der transportier-ten Tiere nach der Schlachtung. Dabei fanden sie in den Mesenteriallymph-knoten auch Spezies, die teilweise mit den in den Fahrzeugen und im Schlachtbereich gefundenen korrespondierten und die vorher in laufenden Untersuchungen, darunter auch Umgebungsuntersuchungen, im Erzeugerbetrieb nie aufgetreten waren. Sie schlossen daraus, daß sich die Schweine in der kurzen Zeit zwischen Verladen und Schlachtung (4 - 6 Stunden) infiziert hatten.

5.1.4. Die Verbreitung von Salmonellen während des Schlachtvorgangs

Die Streuung von Salmonellen während des Schlachtvorgangs und deren Verbreitung durch das Schlachtpersonal selbst, über Arbeitskleidung, Geräte und Werkzeuge hat offenbar eine große Bedeutung. STOLLE und REUTER (1978 a) untersuchten an 17 Schlachttagen Kotproben von Schlachtrindern und parallel dazu Tupferproben aus dem Schlachtbereich auf Salmonellen. Bei 6 von 49 Tiergruppen wurden an 5 Tagen Salmonellen im Kot nachgewiesen, an 3 Tagen davon wurde derselbe Salmonellentyp in unterschiedlicher Verteilung in Wartehalle und Tötungsbucht, auf dem Fußboden der Schlachthalle, auf dem Kuttelstisch sowie auf Messern wiedergefunden. Von insgesamt 65 entnommenen Tupferproben aus dem Schlachtbereich waren an jeder der genannten Stellen 2 positiv.

Die Autoren (STOLLE und REUTER, 1980 b; STOLLE, 1981) untersuchten auch die Verbreitung von Salmonellen während der Rinderschlachtung in einer halbautomatischen Schlachthalle in 12 Arbeitsbereichen. Bei der Untersuchung von Werkzeugen und Ausrüstungen des Schlachtpersonals waren von 768 Tupferproben 14 (= 1,8 %) salmonellen-positiv, wobei die meisten (5) auf den Bereich "Öffnen der Bauchhöhle" fielen. Bei der parallelen Untersuchung von Schlachtwerkzeugen und Tierkörperoberflächen waren von 1.392 Tupferproben 61 (= 4,3 %) positiv, wobei die Funde auf Werkzeugen und Tierkörpern korrelierten und der Schwerpunkt der Funde beim Absetzen der Klauen und beim Vorenthäuten lag.

PIETZSCH und KAWERAU (1984) untersuchten in 5 Schlachthöfen während der Schweineschlachtung 6.734 Kot- und Tupferproben (57 % davon Sammelproben von je 5 Stück), wovon 8 % salmonellen-positiv waren. Es zeigte sich, daß der wesentliche Faktor der Salmonellenverbreitung während der Schlachtung das Schlachttier selbst war. Das heißt, an bestimmten Tagen mit hohem "Salmonellen-Input" fanden sich unabhängig von der technischen Ausstattung des Schlachthofs die eingebrachten Salmonellen auf den Schlachttierkörpern wieder. Füße und Bäuche waren Prädilektionsstellen für die Salmonellenkontamination, mit großer Wahrscheinlichkeit als Folge des Herumtretens und -liegens in salmonellenhaltigem Kot vor der Schlachtung. Eine drastische Erhöhung der Salmonellenkontamination während der Schlachtung trat auch in Schlachtbetrieben, die nicht auf dem modernsten technischen Stand waren, nicht auf.

Eine besondere Gefahr sehen MAYER und VINÇON (1974) im Import von lebenden Schlachtschweinen aus Ländern, in denen die Salmonelleninfektionsraten wesentlich höher sind als bei uns (Niederlande und Belgien). Sie fanden in 7 von 9 Transportfahrzeugen aus Belgien Salmonellen. Außerdem wiesen von 25 transportkranken Schweinen 10 salmonellenhaltigen Kot auf, und in 7 von 9 Schlachthöfen, in denen regelmäßig Importschweine geschlachtet werden, waren Salmonellen nachweisbar. Diese wurden besonders häufig in den Schlachträumen und in der Kuttellei gefunden. Dagegen wurden in 6 Schlachthöfen, in denen keine nennenswerte Schlachtung von Auslandsschweinen erfolgt, keine Salmonellen gefunden.

CHILDERS et. al. (1973) fanden bei ihren Untersuchungen an Rinder-, Schweine- und Schafschlachtungen in den USA, daß durch das Einpacken des Darmendes in Plastikbeutel vor dem Fallenlassen die Keimkontamination bei Rinderschlachtkörpern (Salmonellen wurden hier nicht nachgewiesen) und die Salmonellenkontamination bei Schweinen und Schafen erheblich reduziert wurde. Das Eintauchen des Messers vor dem Absetzen des Enddarms in 82° C heißes Wasser reduzierte die Salmonellenfunde bei Schweinen um 76 - 96 % und bei Schafen um 100 %, während das Abduschen der Tierkörper keinen Erfolg brachte. Von den Schlachteinrichtungen waren bei Schweinen die Eingeweideschalen (zu 13 %) und der Brühtank (zu 13 %), bei Rindern das Kopfkabinett (zu 14 %) und bei Schafen die Eingeweideschalen (zu 50 %) mit Salmonellen kontaminiert.

In einer weiteren Studie stellten CHILDERS et al. (1977) bei Schweine-schlachtungen fest, daß durch Händewaschen mit Seife und die Desinfektion des Messers vor jeder Eviszeration in einer 500 ppm Chlorlösung die Salmonellenfunde von 6 auf 3 % der Tierkörper reduziert wurden. Trug der Eviszierierende bei jedem Tier einen frischen Plastikhandschuh und dekontaminierte er das Messer vor jeder neuen Benutzung in 82° C heißem Wasser, so sank die Tierkörperkontaminationsrate von 22 auf 2 %.

5.2. Salmonellenfunde im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung

Den jährlich an die Zentralstelle für Veterinärmedizinische Salmonelloseforschung am Bundesgesundheitsamt gemeldeten Zahlen (PIETZSCH, 1982) ist zu entnehmen, daß in der Bundesrepublik Deutschland einschließlich West-Berlin zwischen 1965 und 1981 4.080.897 Bakteriologische Fleischuntersuchungen durchgeführt wurden, was einem Jahresdurchschnitt von etwa 240.000 entspricht. In diesem Zeitraum waren 44.751 Proben (1,1 %) salmonellen-positiv, wobei die Schwankungsbreite in den einzelnen Jahren zwischen 0,77 % und 1,7 % lag.

Eine Auswertung der im Zusammenhang mit Salmonellenfunden im Rahmen der BU erhobenen Vorberichte und Angaben über die häufigsten pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den geschlachteten Tieren ist in Tab. 2 dargestellt. Die Zahlen zeigen deutlich, daß Salmonellendauerausscheider hauptsächlich bei erwachsenen Rindern auftreten und kaum beim Schwein, was wohl unter anderem auch auf die verstärkte Überwachung aufgrund der Rindersalmonellose-Verordnung zurückzuführen sein dürfte. Im Vergleich zum Gesamtzeitraum von 21 Jahren war jedoch die Entwicklung in den letzten 10 Jahren rückläufig. Im Vordergrund stehen bei den pathologisch-anatomischen Erhebungen Erkrankungen der Lunge, insbesondere bei Kalb und Schwein, sowie Erkrankungen von Leber und Galle, insbesondere bei Rind und Kalb, mit abnehmender Tendenz beim Rind und steigender Tendenz beim Kalb. Dazu kommen Erkrankungen des Darmes, insbesondere beim Kalb und auch beim Rind, jeweils mit fallender Tendenz, und Erkrankungen der Nieren, besonders beim Kalb, mit steigender Tendenz. Auffällig ist auch der relativ hohe Anteil an Schweinen mit Herzerkrankungen mit steigender Tendenz.

Tab. 2: Übersicht über die prozentuale Verteilung der in den Jahren 1961 - 1981 (1972-1981) im Zusammenhang mit Salmonellenfunden im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchungen erhobenen Vorberichte und häufigsten pathologisch-anatomischen Befunde (nach PIETZSCH, 1982)

	Rind		Kalb		Schwein	
Nachweise insgesamt	16.470	(6.489)	11.687		10.738	(6.116)
<u>Vorbericht:</u>						
Notschlachtung	24,25	(15,41) %	27,78	(7,81) %	23,65	(15,93) %
Krankschlachtung	6,64	(3,59) %	6,39	(7,36) %	5,47	(2,29) %
Normalschlachtung	3,08	(1,01) %	4,83	(4,07) %	2,35	(0,88) %
keine Lebendbeschau	0,67	(0,23) %	0,33	(0,18) %	1,32	(1,46) %
Salmonellendaueraus-						
scheider	15,13	(7,63) %	5,78	(5,88) %	1,24	(1,70) %
<u>Erkrankung von:</u>						
Lunge	12,82	(13,87) %	29,91	(31,80) %	21,87	(20,60) %
Leber/Galle	25,40	(19,86) %	19,93	(23,72) %	11,24	(10,30) %
Darm	13,96	(10,59) %	17,33	(10,21) %	9,54	(9,35) %
Niere	8,94	(10,36) %	15,50	(22,12) %	9,55	(11,36) %
Muskulatur	5,63	(6,43) %	5,98	(5,49) %	8,82	(8,68) %
Milz/Lymphknoten	6,14	(2,82) %	8,71	(10,12) %	3,51	(2,35) %
Herz	3,73	(3,94) %	2,10	(1,69) %	11,48	(14,08) %
Bauchfell	5,65	(7,63) %	1,39	(1,95) %	4,27	(5,26) %
Euter	4,23	(5,98) %	0,03	(0,04) %	0,34	(0,37) %
ohne Befund	3,83	(2,57) %	4,47	(3,86) %	5,69	(5,66) %

() = Zeitraum 1972 - 1981

5.3. Die Bedeutung der Salmonellen aus lebensmittelhygienischer Sicht

In den Jahren 1968 bis 1978 traten in der Bundesrepublik Deutschland und in West-Berlin laut Literaturangaben (SINELL und KOLB, 1981) 182 Ausbrüche von menschlichen Salmonellosen auf, wobei 8.451 Personen erkrankten und zum Teil starben. Diese Zahlen stellen 79,5 % aller Ausbrüche und 68,9 % aller Einzelerkrankungen an Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen in diesem Zeitraum dar. Die Tatsache, daß die meisten Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen auf den Genuß von Fleisch und Fleischerzeugnissen (ca. 40 %) zurückgeführt wurde, unterstreicht die lebensmittelhygienische Bedeutung der Schlachttiere.

Eine pauschale Festlegung einer Mindestmenge an Salmonellen, die beim erwachsenen Menschen nach oraler Aufnahme zu einer Erkrankung führen kann, ist nicht möglich. Es kann allenfalls gesagt werden, daß die Aufnahme von mehr als 10^5 Keimen, gelegentlich aber auch schon von geringeren Mengen, ein Erkrankungsrisiko darstellt (PIETZSCH, 1981). Es ist zwar nicht zu erwarten, daß der Verbraucher im Normalfall durch den Genuß von Fleisch und Organen von pathologisch-anatomisch unauffälligen Schlachttieren oder bei der Schlachtung oberflächlich kontaminierten Tieren erkrankt, aber die Untersuchungen von KERSCHNER (1980) haben gezeigt, daß die Kontamination von Schweineinnereien von der Schlachtung über den Großhandel bis hin zum Einzelhandel ständig zunimmt.

Die klinischen Erscheinungen einer gastroenteritischen Salmonellose beginnen beim Menschen nach einer Inkubationszeit von 6 - 48 Stunden (LOTT, 1970). Sie können oft mit denen von Grippe verwechselt werden. Es treten Gliederschmerzen, Fieber, Kopfschmerzen, Durchfall, teilweise Erbrechen und in schweren Fällen Kreislaufkollaps und Exsiccation auf. Die Schwere der Symptome ist von der aufgenommenen Erregermenge abhängig.

5.4. Nachweis von Salmonellen

Da Salmonellen im Untersuchungsmaterial meist in Mischkultur mit anderen gramnegativen und grampositiven Keimen, noch dazu in vergleichsweise geringer Menge, vorliegen, sind sie mit festen Nährböden häufig nur schwer nachzuweisen. Daher wurden verschiedene flüssige Anreicherungsmedien

entwickelt, in denen sich Salmonellen bei gleichzeitiger Unterdrückung der Begleitflora durch verschiedene Hemmstoffe vermehren können. Daneben haben diese flüssigen Medien den Vorteil, daß man sie mit größeren Mengen an Untersuchungsmaterial beimpfen kann als feste Nährböden.

5.4.1. Anreicherung von Salmonellen in flüssigen Nährböden

Bereits VINCENT verwendete 1890 fünf Tropfen Phenollösung (5%ig) auf 10 ml Bouillon, die er als Anreicherungsmedium für 5 - 10 Tropfen abwasserbelastetes Wasser benutzte (HARVEY und PRICE, 1979). Die heute hauptsächlich benutzten Anreicherungssysteme sind die des Tetrathionat- und die des Selenit-Typs.

MULLER (1923) beschrieb die Natriumtetrathionat-Anreicherung, in der das Tetrathionat durch Zugabe von Jod und Natriumthiosulfat entsteht. KAUFFMANN (1930, 1935) modifizierte dieses Medium durch Zugabe von Ochsen-galle und Brillantgrün, um das Wachstum von *Proteus* sp. zu hemmen. Eine Modifikation der Tetrathionatanreicherung nach MULLER-KAUFFMANN (MK, EDEL und KAMPELMACHER, 1969) wurde als Referenzmethode für den Salmonellenachweis aus Fleisch und Fleischerzeugnissen übernommen (N.N., 1980; PIETZSCH, 1981). PREUSS (1949) ersetzte in dem nach ihm benannten Medium Natriumthiosulfat und Jod durch Kaliumtetrathionat und Brillantgrün durch Kristallviolett.

GUTH (1916) verwendete als erster Natriumselenit als Hemmstoff in einer Salmonellenanreicherung. LEIFSON (1936) entwickelte mehrere Medien mit verschiedenen Konzentrationen von Natriumselenit. Das Selenit F - Medium ist heute noch gebräuchlich. Durch Zugabe von Cystin, um das Wachstum von Salmonellen im Beisein von organischem Material zu fördern, und weitere Modifikationen wurde das Selenit-Cystin-Medium (SC) geschaffen (NORTH und BARTRAM, 1953).

OSBORNE und STOKES (1955) veränderten die Selenitanreicherung durch Zugabe von Brillantgrün und Natriumtaurocholat, die das Wachstum von *Escherichia* und *Proteus* sp. hemmen sollten. In einer weiteren Modifikation wurde noch Sulfapyridin zugegeben (OSBORNE und STOKES, 1955). RAPPAPORT et al. (1956) entwickelten eine Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Anreicherung, die für die Untersuchung von Kotproben gut geeignet ist, aber mit der *S. typhi* nicht nachgewiesen werden kann. Sie wurde von VASSILIADIS et al. (1981) durch Reduzierung des Malachitgrünanteils

modifiziert und verbessert.

Neben den oben genannten Anreicherungsmedien wurden u. a. noch die Strontium-Selenit- und Strontiumchlorid-Bouillon (IVESON und MACKAY-SCOLLAY, 1969), die Neutralrot-Lysin-Eisen-Cystin-Bouillon (HARGROVE et al., 1971) und die Gramnegativen (GN)-Bouillon (HAJNA, 1955) beschrieben.

Die Art und Menge des Inokulums ist bei der Salmonellenanreicherung insbesondere dann von Bedeutung, wenn nur wenige Salmonellen darin vorkommen. Man geht heute meistens von einem Verhältnis Inokulum : Anreicherung von 1:10 aus, wobei insbesondere bei Lebensmitteluntersuchungen eine Probenmenge von 25 g oder ml zugrundegelegt wird. Bei Kot oder Schmutz ist dagegen ein Verhältnis von 5 g zu 95 ml Anreicherung und bei eiweißhaltigen tierischen Futtermitteln von 1:5 am günstigsten (PIETZSCH, 1981).

Durch Hitze, Gefrieren, Trocknen oder Bestrahlen subletal geschädigte oder nur in geringer Menge vorhandene Salmonellen lassen sich häufig in einer selektiven Anreicherung nur schwer nachweisen, daher wird in solchen Fällen eine nichtselektive Voranreicherung, z. B. in gepuffertem Peptonwasser, 1/4 starker Ringerlösung, Nährbouillon oder Laktosebouillon, Tryptose-Soja-Bouillon oder Glucose-Mineralsalz-Nährböden empfohlen (HARVEY und PRICE, 1979; PIETZSCH, 1981). Quantitative Untersuchungen (MULINDWA und PIETZSCH, 1979) zeigten, daß nach 18 - 24stündiger Bebrütung eines Keimgemisches in gepuffertem Peptonwasser alle Enterobakterien eine durchschnittliche Keimzahl von 10^8 /ml erreichten, unabhängig davon, wie groß die Ausgangsmenge war, während nach 5 - 8 Stunden noch große Mengenunterschiede in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge bestanden. Laut PIETZSCH (1976) ist eine Voranreicherung bei 37° C mit anschließender Selektivanreicherung in MK bei 43° C einer direkten Anreicherung bei 37° C oder 43° C vor allem dann überlegen, wenn weniger als 5 Salmonellen/g vorliegen.

Üblicherweise werden nach 18 - 24 Stunden Bebrütung der selektiven Anreicherungsmedien Ausstriche auf feste Nährböden ausgelegt, da ein vorheriger Ausstrich nur unzuverlässige Ergebnisse bringt. Die Wiederholung dieser Ausstriche nach 42 - 48 Stunden oder auch nach 72 oder gar 96

Stunden verbessert in vielen Fällen die Ausbeute an Salmonellen, wenn die Salmonellen in geringer Menge vorliegen oder eine hohe Hemmstoffkonzentration vorliegt (FAGERBERG und AVENS, 1976; HARVEY und PRICE, 1979; PIETZSCH, 1981). EDEL und KAMPELMACHER (1969) fanden in einer internationalen Vergleichsuntersuchung, daß eine zweite Abimpfung aus dem Anreicherungsmedium nach 48 Stunden Bebrütung zum Teil erheblich höhere Salmonellennachweisraten erbrachte.

HARVEY und THOMSON (1953) stellten fest, daß bei 43° C bebrütete Selenit F-Brühe ein optimales Medium für den Nachweis von Salmonellen aus Kotproben darstellt, allerdings war die Nachweisrate für *S. typhi* und *S. pullorum* nicht befriedigend. Höhere Temperaturen erwiesen sich als toxisch. 1968 erzielten HARVEY und PRICE ähnliche Ergebnisse mit Abwasserproben und fanden bei Vergleichsuntersuchungen, daß z. B. RAPPAPORTS Medium für Bebrütung bei 43° C weniger geeignet ist. EDEL und KAMPELMACHER (1969) verwendeten MK in einer internationalen Vergleichsuntersuchung mit Erfolg bei 43° C.

Verschiedene Autoren haben erhöhte Bebrütungstemperaturen (41 - 43° C) für den Nachweis von Salmonellen aus Reinkulturen, Wasser und Abwasser, Hackfleisch, Wurst, Milch und anderen Lebensmitteln, Fleisch- und Knochenmehl, tierischen Nebenprodukten und Sektionsmaterial verwendet. Den größten Vorteil fanden sie darin, daß Begleitkeime, aber nicht Salmonellen, in ihrem Wachstum gehindert werden, und die Salmonellen sich deshalb schneller vermehren und häufig in Reinkultur vorliegen (FAGERBERG und AVENS, 1976).

Neueste Untersuchungen von PIETZSCH und KAWERAU (1984) haben gezeigt, daß bei der Untersuchung von Schweinekotproben die Voranreicherung von 5 g Kot in 45 ml Peptonwasser bei 37° C für 18 bis 24 Stunden und die darauffolgende Übertragung von 0,1 ml in 10 ml Anreicherungsmedium nach RAPPAPORT, modifiziert nach VASSILIADIS mit zusätzlicher Modifikation (Novobiocin-Zusatz) nach ALCAIDE, nach 18 bis 24 Stunden Bebrütung bei 43° C viel bessere Ergebnisse ermöglichte, als die direkte Anreicherung von 25 g Kot in 225 ml MK bei 43° C. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der

Untersuchung von Schweinehackfleisch nach Voranreicherung von 100 g in 900 ml Peptonwasser und anschließender Überimpfung von 0,1 ml in 10 ml modifiziertes RAPPAPORT-Medium und 10 ml in 100ml MK, die Bebrütung erfolgte jeweils bei 43⁰ C, erzielt. Als weiterer Vorteil der neuen Methode wurde die weitgehende Unterdrückung der Begleitflora, insbesondere von *Proteus* sp., erwähnt. Diese Ergebnisse zeigen, wie bei optimaler Kombination von Voranreicherungs- und Anreicherungssystem Materialkosten gespart werden können und noch dazu die Ausbeute der Untersuchung verbessert wird.

Wie von vielen Autoren berichtet wurde, werden verschiedene Salmonellenspezies in einigen Anreicherungsmedien in ihrem Wachstum teilweise oder ganz gehemmt. PIETZSCH (1981) bezeichnet diese als anreicherungsempfindliche Spezies, die meist wirtspezifisch sind. Es bedarf besonderer Methoden, um wirtspezifische Spezies zu isolieren, wozu der Einsatz mehrerer selektiver und nichtselektiver Anreicherungssysteme und das Ausimpfen der Anreicherung auf nichtselektive Nährböden wie z. B. Blutplatten gehören.

Durch möglichst intensive Zerkleinerung des Probenmaterials und möglichst homogene Vermischung mit dem Anreicherungsmedium kann der Salmonellennachweis verbessert werden (PIETZSCH, 1981). Die Homogenisation von Probenmaterial ist auch im Referenzverfahren für die Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen (N. N., 1980) vorgesehen. BAILEY et al. (1981) homogenisierten frisches Hackfleisch und Schweinewurstchen, indem sie 10 g der Probe zu 40 ml Selenit-Cystin- oder Tetrathionatbrühe gaben und in einem Kunststoffbeutel mit einem COLWORTH Stomacher 80 bearbeiteten. Sie zerkleinerten auch verschiedene Lebensmittel in steriler Kochsalzlösung und beimpften mit einem relativ großen Volumen Homogenisat mehrfach konzentrierte Selenit-Cystin- und Tetrathionatanreicherung, dadurch konnten die Proben gleichmäßig auf mehrere Anreicherungen verteilt werden und mußten nur einmal homogenisiert werden. Laut PIETZSCH (1982) hat es sich in seinem Labor bewährt, die Stomacherbeutel nach dem Homogenisieren mittels Clips zu verschließen und im Brutschrank aufzuhängen, was die Reinigung von Glaswaren erspart.

Die Ausbeute an Salmonellen kann auch durch mehrstufige Anreicherung, d. h. z. B. durch Überimpfung einer 24-stündigen Kultur im Verhältnis 1 : 10 auf ein frisches gleichartiges oder andersartiges Medium, verbessert werden oder durch Agitation des Mediums während der Bebrütung. Es wurde allerdings auch berichtet, daß durch das Schütteln eine Verschlechterung eintrat, möglicherweise weil durch die Sauerstoffzufuhr sich toxisch wirkende Substanzen bildeten. Bei stark fetthaltigen Proben (z. B. Wurst) hat sich der Zusatz von Emulgatoren wie "Tween 80" bewährt (PIETZSCH, 1981).

Die Wahl des geeigneten Anreicherungsmediums für ein bestimmtes Untersuchungsmaterial ist weniger von der zu erwartenden Salmonellenspezies oder von der Art und Menge der Begleitflora abhängig, sondern vom zu untersuchenden Material selbst, da organisches Material die Selektivität und Anreicherungsqualität eines Mediums beeinflussen kann, insbesondere durch seinen pH-Wert, seinen Salz-, Zucker-, Fett- und Feuchtigkeitsgehalt und den Gehalt an Nährstoffen. Es empfiehlt sich, mehrere Anreicherungsmedien zu verwenden, da dadurch die Salmonellenausbeute erhöht wird (FAGERBERG und AVENS, 1976).

5.4.2. Kultivierung auf festen Nährböden

Die meisten heute verwendeten festen Nährböden zum Nachweis von Salmonellen machen sich die biochemische Eigenschaft von meist nicht zur Salmonella-Gruppe gehörenden Bakterien zunutze, im Gegensatz zu Salmonellen Laktose (und Saccharose) zu spalten, was durch Säuerung zu einem Farbumschlag des Indikatorfarbstoffes führt. Daneben wird die Fähigkeit der Salmonellen, Sulfite zu schwarzen, ausgefällten Sulfiden zu reduzieren, als Indikator benutzt. Durch den Zusatz von geeigneten Hemmstoffen, die gebräuchlichsten sind Brilliantgrün, Gallesalze und Kristallviolett, wird die grampositive und auch die gramnegative Begleitflora mehr oder weniger stark gehemmt. Es ist insbesondere erstrebenswert, das Schwärmen von *Proteus* sp. zu unterdrücken (FAGERBERG und AVENS, 1976; HARVEY und PRICE, 1979; PIETZSCH, 1981). Die heute in Deutschland gebräuchlichsten Nährböden sind in Tab. 3 aufgeführt.

übersicht über die heute in der
Bundesrepublik Deutschland
gebräuchlichen Selektivnährböden
für Salmonellen nach PIETZSCH
(1981; 1984) und MERCK (1984)

Tab. 3:

Übersicht über die heute in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Selektivnährböden für Salmonellen nach PIETZSCH (1981; 1984) und MERCK (1984)

	Galle, -salze	Desoxycholat	Natriumcitrat	Natriumthiosulfat	Natriumsulfit	Wismut	Brillantgrün	Kristallviolett	Fuchsin / Eosin	Methylenblau	Metachromgelb	Pril	Schwärzung von Kolonien infolge Sulfidbildung
Brillantgrün-Phenolrot-Laktose (BPL)-Agar nach KAUFMANN							+						
Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose (BPLS)-Agar nach KAUFMANN bzw. modifiziert							+						
Bromkresolpurpur-Laktose-Agar							+						
Desoxycholat-Citrat-Laktose-Saccharose (DCLS)-Agar nach LEIFSON bzw. modifiziert		+	+	+									teilw. +
Eosin-Methylenblau-Laktose (EMB)-Agar nach LEVINE								+	+				
Fuchsin-Laktose-Agar nach ENDO				+				+					
Hektoen-Agar nach KING und METZGER	+			+				+					überw. +
Lackmus-Laktose-Agar mit/ohne Kristallviolett nach DRIGALSKI und CONRADI								+/-					
Mc CONKEY-Agar	+							+					
Pril-Mannit-Agar											+	+	
Salmonellen-Shigellen (SS)-Agar	+		+	+				+					teilw. +
Salmonellen-Shigellen (SS)-GASSNER-Agar nach ÖWÜZ und HOFFMANN	+		+	+				+			+		überw. +
Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-(Saccharose)-Agar nach GASSNER										+			
Wismut-Sulfit-Agar nach WILSON und BLAIR					+		+						+
Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar nach TAYLOR, TAYLOR und HARRIS		+		+									überw. +

Nach PIETZSCH (1981) eignet sich für die Suche nach weniger anspruchsvollen Salmonellen der Brillantgrün-Laktose-Saccharose-Agar. Für die Suche nach *S. typhi* oder tierartspezifischen Salmonellen sollte er jedoch durch andere, weniger hemmende Nährböden ersetzt oder ergänzt werden. In den meisten Literaturangaben über den kulturellen Nachweis von Salmonellen werden zwei oder auch mehr Plattenmedien angeführt; auch in der Bakteriologischen Fleischuntersuchung sind zwei verschiedene Medien vorgeschrieben. Laut FAGERBERG und AVENS (1976) werden Brillantgrünnährböden von amerikanischen Institutionen für den Salmonellenachweis empfohlen, teilweise sogar als einzige Nährböden. Ebenso wie HARVEY und PRICE (1979) berichteten sie, daß viele Autoren Brillantgrünnährböden für die besten Routinenährböden halten.

Das Schwärmen von *Proteus* sp. kann bei der Suche nach Salmonellen, insbesondere auf wenig hemmenden Nährböden, Probleme verursachen. In solchen Fällen empfiehlt sich die Verwendung von Pril-Mannit-Agar (PIETZSCH, 1967). Die oberflächenaktiven Substanzen verhindern das Schwärmen, anhand der erfolgten Mannitvergärung können Salmonellen zwar von *Proteus* sp., aber nicht von coliformen Keimen unterschieden werden.

EDEL und KAMPELMACHER (1969) stellten nach der Auswertung einer Vergleichsuntersuchung in 9 europäischen Laboratorien fest, daß die laboreigenen Anreicherungs- und Plattierungsverfahren in einigen Fällen besser, in anderen Fällen schlechter waren als eine Standardmethode. Allerdings waren in Laboratorien, in denen mit eigenen Methoden relativ schlechte Ergebnisse erzielt wurden, auch die Ergebnisse mit der Standardmethode relativ schlecht und umgekehrt, ein Zeichen, daß trotz aller technischen Faktoren die persönliche Erfahrung des Bakteriologen bei der Bewertung der auf den Selektivplatten gewachsenen Kolonien eine große Rolle spielt.

5.4.3. Identifizierung von Salmonellen

Nach PIETZSCH (1976) erfolgt die Identifizierung von salmonellenverdächtigen Kolonien in der Bundesrepublik Deutschland mittels eines staatlich geprüften, polyvalenten *Salmonella*-Antiserums. Läßt sich mit Hilfe von Faktorenseren eine einwandfreie endgültige Typisierung durchführen, ist

keine weitere Untersuchung erforderlich. In Zweifelsfällen sollen biochemische Tests auf Laktose- und Harnstoffspaltung, Indolbildung, Lysin-decarboxylaseaktivität und VOGES-PROSKAUER-Reaktion bei Zimmertemperatur und bei 37°C durchgeführt werden.

Weitere geeignete biochemische Reaktionen sind nach PIETZSCH (1981): KCN-Test; Nachweis von weiteren Aminosäurendecarboxylasen; Fermentation von Kohlehydraten; Methylrot-Reaktion; beta-Galaktosidase-Nachweis durch ONPG-Spaltung; Phenylalanin-Desaminase-Nachweis; H_2S -Bildung; Gelatineverflüssigung; Nutzung von Citrat als einzige Kohlenstoffquelle; Verwertung von Natriummalonat.

5.4.4. Amtliche Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Salmonellen

Für die Untersuchung von Fleisch gibt es derzeit in der Bundesrepublik Deutschland zwei amtliche Verfahren, nämlich die Vorschriften nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG für die Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen (N. N., 1980), sachlich übereinstimmend mit der Norm DIN 10 160, die auf dem ISO-Standard 3565-1975 basiert, und die noch geltende Anlage 1 zu § 20 Abs. 3 der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz, die die Vorschriften über die Bakteriologische Fleischuntersuchung enthält.

Nach dem Referenzverfahren zu § 35 LMBG wird eine repräsentative Probe von mindestens 200 g zweimal mit einem Fleischwolf (Lochdurchmesser höchstens 4 mm) zerkleinert. 25 g dieser Probe werden in einem hochtourigen Mixgerät mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser bei einer Drehzahl von $15.000 - 20.000 \text{ min}^{-1}$ höchstens 2,5 Minuten lang homogenisiert und danach 18 ± 2 Stunden lang bei $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ vorangereichert. Danach werden je 10 ml in 100 ml MK bei $42 - 43^{\circ}\text{C}$ und 100 ml Selenit-Brillantgrün-Nährboden nach STOKES und OSBORNE bei $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ höchstens 2 Tage lang bebrütet. Nach 21 ± 3 Stunden und nochmals nach 2 Tagen wird ein Ösenausstrich auf einer großen oder zwei kleinen Petri-Schalen (mit derselben Öse) BPLS nach EDEL und KAMPELMACHER angelegt und, falls gewünscht, zusätzlich auf einem anderen Selektivnährboden nach Wahl des Labors. Danach werden die beimpften Platten 22 ± 2 Stunden lang bei $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ bebrütet und auf typische Salmonellenkulturen untersucht.

Dabei ist die Agglutination verdächtiger Kolonien mit einem omnivalenten *Salmonella*-Antiserum sehr hilfreich. Liegen keine verdächtigen Kolonien vor, oder ist der Bewuchs der Platten schwach, so wird die Bebrütung wiederholt. Mindestens 5 typische oder verdächtige Kolonien werden auf getrocknetem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar ausgestrichen, dieser wird 22 ± 2 Stunden bebrütet, danach erfolgt die biochemische und serologische Überprüfung der Einzelkolonien. Biochemisch werden die Kolonien auf für *Salmonellen* typische Reaktionen untersucht, nämlich Glucoseumsetzung mit Säure- und Gasbildung, Schwefelwasserstoffbildung und fehlende Laktose- und Saccharosespaltung auf Dreizucker-Eisen-Agar, sowie Lysin-Decarboxylierung, fehlende Harnstoffspaltung und negative beta-Galactosidase-, VOGES-PROSKAUER- und Indolreaktion auf vorgeschriebenen Nährböden. Die serologische Untersuchung besteht aus der Prüfung auf fehlende Selbstagglutination in physiologischer Kochsalzlösung, sowie auf O-, Vi- und H-Antigene mit mono- oder polyvalenten Seren.

Im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung wird je eine haselnußgroße, nach dem Abflammen steril entnommene Probe aus den beiden Muskelstücken und Fleischlymphknoten, aus Milz, Niere, Leber und Leberlymphknoten, sowie aus veränderten Teilen und bei *Salmonellenausscheidern* aus den Mesenteriallymphknoten und dem Darm mit sterilen Instrumenten unter Verwendung möglichst vieler Seiten auf mindestens je eine halbe BPL-Platte und eine weitere Buntplatte nach Wahl ausgestrichen. 0,5 ml Galle werden auf einer BPL-Platte und anschließend einer weiteren Selektivplatte von je 13 cm Durchmesser oder auf je 2 Platten jeder Art mit demselben Spatel ausgestrichen. Die Platten werden anschließend mindestens 18 Stunden lang bei 37° C bebrütet. Ein bohnergroßes, steril entnommenes Stück jeder Probe wird möglichst fein zerkleinert und in 50 ml Anreicherungsflüssigkeit nach BIERBRAUER oder PREUSS oder in Selenitbrühe versenkt, wobei die Proben des Leber- und Gallensystems getrennt angesetzt werden. Nach mindestens 10 Stunden Bebrütung bei 37° C werden Plattenausstriche angelegt, indem man 4 - 6 Tropfen Anreicherungsflüssigkeit auf einer BPL-Platte und anschließend mit demselben Spatel auf einer weiteren BPL-Platte und einer zweiten Selektivplatte nach Wahl ausstreicht und diese mindestens 14 Stunden lang bei 37° C bebrütet.

Verdächtige Kolonien werden mit omnivalentem Salmonellenserum verrieben und auf Agglutination geprüft, positiv oder zweifelhaft reagierende Kolonien werden zusätzlich mit 1 : 10 verdünntem Normalserum und mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Eine weitere Differenzierung erfolgt mit O- und H-Antisera. Eine Reinkultur verdächtiger Kolonien wird zusätzlich auf fehlende Indolbildung und ihr biochemisches Verhalten gegenüber Laktose, Saccharose, Adonit, Salicin, Arabinose, Dulcitol und Rhamnose geprüft.

Betrachtet man die Vorschriften über die Bakteriologische Fleischuntersuchung aus dem Jahre 1940 im Vergleich zu den vorangegangenen Ausführungen über den Salmonellennachweis bei der lebensmittelrechtlichen Referenzmethode, so wird deutlich, daß eine Reform dringend nötig ist. PIETZSCH machte bereits 1974 Vorschläge zur methodischen Verbesserung des Salmonellennachweises. Diese beinhalten die Einführung der BPLS-Platte in Kombination mit einer weiteren Buntplatte (GASSNER-Agar, DRIGALSKI-Agar, Bromkresolpurpur-Laktose-Agar, SS-Agar oder DCLS-Agar nach Wahl), eine Voranreicherung in 100 ml gepuffertem Peptonwasser für 18 Stunden und anschließende Überimpfung von 10 ml in 100 ml MK, die vor dem Ösenausstrich auf feste Nährböden wie oben 18 bis 24 Stunden bei 37° oder 43° C bebrütet werden sollte. Außerdem hielt er es für vertretbar, die biochemische Differenzierung verdächtiger Kolonien wegen der staatlichen Kontrolle von polyvalenten Salmonellen-Antisera und Faktorsera nur auf serologische Zweifelsfälle zu beschränken. In diesen Fällen sollten die biochemischen Reaktionen auf Laktose- und Harnstoffspaltung, Indolbildung, VOGES-PROSKAUER-Test bei Zimmertemperatur und bei 37° C und die Lysin-Decarboxylasereaktion beschränkt werden. Dagegen plädierten REUSSE et al. (1975) und REUSSE (1978) nicht für eine Voranreicherung bei der BU, da die Salmonellen hier nicht vorgeschädigt sind, auch eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf 48 Stunden hielten sie nicht für erforderlich. Sie konnten in künstlich infizierten Proben bei Anwendung von MK bei 43° C für 24 Stunden geringe Mengen an Salmonellen (5 bzw. 50/50 ml) im Beisein einer Begleitflora besser nachweisen, als mit PREUSS (PR)- oder Selenit-Anreicherung bei 37° C, während nach 48 Stunden Bebrütung alle 3 Anreicherungen gleich effizient waren. Die Bebrütung bei 43° C unterdrückte allerdings das Schwärmen von *Proteus* sp., was jedoch auch durch die Verwendung von Pril-Mannit-Agar oder XLD erreicht werden konnte. Bei Routine-BU-Proben ergaben sich keine

Unterschiede zwischen der Bebrütung bei 37° C und 43° C. STOLLE und REUTER (1980 a) forderten die zeitgemäße Anpassung der Methodik im Rahmen der BU an den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand und an deutsche und internationale Referenzmethoden.

6. Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Clostridien

Im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung ist eine Untersuchung auf "Clostridien" vorgeschrieben. Im Gegensatz zu anderen, in der AB.A mehr oder weniger definierten Erregern, handelt es sich bei Clostridien um eine Gattung der Familie der Bazillazeen, der laut BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (SMITH und HOBBS, 1974) alle anaerob wachsenden endosporenbildenden, im allgemeinen grampositiven Stäbchen, die Sulfat nicht zu Sulfid reduzieren, angehören. Bisher wurden über 300 Spezies von verschiedenen Autoren beschrieben. Die Taxonomie ist verwirrend, da nicht genügend Daten über die einzelnen Spezies vorliegen. So sind in BERGEY'S Manual 61 Arten beschrieben, dazu 34 weitere, von denen keine Testkulturen vorliegen.

6.1. Vorkommen und Bedeutung von Clostridien

Clostridien sind in der Natur sehr weit verbreitet, sie finden sich hauptsächlich im Erdboden sowie im Darmtrakt von Mensch und Tier (SMITH und HOBBS, 1974; JUNG und SCHALLEHN, 1977). Die für Mensch und Tier pathogenen Clostridien sind nach der Art der durch sie hervorgerufenen Erkrankungen in Anlehnung an SCHOOP (1980) in Tab. 4 zusammengefaßt. Mit Ausnahme von Rauschbrand und Tetanus wird keine der angesprochenen Erkrankungen in der AB.A direkt angesprochen und geregelt. Neben den in der tabellarischen Übersicht aufgeführten Clostridienarten können laut einer Literaturstudie von EISGRUBER und REUTER (1981) in Fleisch und Fleischprodukten noch folgende als saprophytäre und körpereigene Spezies vorkommen: *Cl. paraperfringens*, *Cl. parasporogenes*, *Cl. bifermentans*, *Cl. parabifermentans*, *Cl. mucosum*, *Cl. putrificum*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. putrefaciens*, *Cl. fallax*, *Cl. innominatum*, *Cl. tertium*, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. saccharobutyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. multif fermentans*, *Cl. lentoputrescens*, *Cl. thermosaccharolyticum*.

Tab. 4: Clostridiosen bei Mensch und Tier nach SCHOOP (1980)

Seuchenartige Clostridiosen

Infektionen:

Rauschbrand	Cl. chauvoei
Bradsot der Schafe	Cl. septicum
Hepatitis necroticans infectiosa v. Schaf u. Rind	Cl. novyi Typ B
Clostridielle Hämoglobinurie	Cl. novyi Typ D
Osteomyelitis der Boviden	Cl. novyi Typ C
Clostridielle Mastitis	Cl. perfringens Typ A bzw. Cl. septicum beim Schaf

Enterotoxämien:

	Cl. perfringens
Lebensmittelintoxikation Mensch	}
Toxämie von Lämmern (selten, i. d. USA)	
Nekrotische Enteritis von Lämmern	}
Enterotoxämie Fohlen	
Enterotoxämie v. Schaf und Ziege	
Nekrotische Enteritis des Menschen	}
Enterotoxämie bei Schafen (Struck)	
Enterotoxämie v. Lämmern und Kälbern (USA)	
Enterotoxämie v. Ferkeln	
Toxämie bei Schafen jeden Alters	}
gel. bei Darmverschluß des Menschen isoliert	
Clostr. Enterotoxämie Kalb und Rind	Typ A - D
Clostr. Enterotoxämie Älterer Ferkel u. Schweine	Typ A, C, D

Toxämien:

Botulismus bei Mensch und Tier	Cl. botulinum
--------------------------------	---------------

Wundclostridiosen

Infektionen durch

Cl. chauvoei : Rauschbrand
Cl. septicum: Pararauschbrand, malignes Ödem I
Cl. novyi Typ A: malignes Ödem II
Cl. perfringens Typ A: Gasödem (haupts. Mensch)

Toxämien:

Cl. tetani: Wundstarrkrampf bei Mensch u. Tier

Mischinfektionen mit anderen Clostridien:

Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. histolyticum u. a.

Mischinfektionen mit Aerobiern:

Cl. perfringens, Cl. histolyticum, Cl. sordellii, Cl. carnis, Cl. ramosum, Cl. sporogenes

AMTSBERG et al. (1976) wiesen in 15,9 % von 549 untersuchten Kotproben von Schweinen aller Altersgruppen *Cl. perfringens*, meist Typ A, nach, wobei bei Mastschweinen mit Diarrhoe der Anteil höher (27,1 %) war als bei solchen ohne Diarrhoe. SINHA et al. (1975) fanden bei 54 % von 50 untersuchten Kotproben von gesunden Schweinen *Cl. perfringens*, meist Typ A, und stellten fest, daß in der internationalen Literatur der Prozentsatz meist höher liegt. NARAYAN (1967 b) dagegen fand im Caecalinhalt bei 5 von 67 Schweinen hitzeresistente Stämme von *Cl. perfringens* Typ A und bei einem *Cl. botulinum* Typ A. Laut MANSSON und OLHAGEN (1967) fördert ein hoher Gehalt an tierischem Eiweiß im Futter die Konzentration von *Cl. perfringens* in der Darmflora.

Bei Kälbern fanden AMTSBERG et al. (1977) in 33,9 % von 168 Kotproben *Cl. perfringens*, meist Typ A, ohne daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von hohen Keimkonzentrationen und Enteritis sichtbar wurde. SINHA et al. (1975) wiesen bei 37 % von 54 klinisch gesunden Rindern *Cl. perfringens*, meist Typ A, nach und stellten auch hier fest, daß in der internationalen Literatur teilweise eine viel höhere Nachweisrate angegeben wurde. NARAYAN (1967 a) fand im Caecalinhalt bei 2 von 50 untersuchten Rindern *Cl. botulinum* Typ A.

Verschiedene Autoren untersuchten Schlachttierkörper auf Clostridien. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Es fällt auf, daß Muskulatur und Organe von nicht ausgeruhten oder kurz vor der Schlachtung noch gefütterten Tieren, ebenso wie die von krankgeschlachteten, in einem höheren Maße mit Clostridien kontaminiert sind, als die von ausgeruhten und ungefütterten bzw. normalgeschlachteten Tieren. BALTZER und WILSON (1965) untersuchten die Haut von unter hygienischen Bedingungen geschlachteten Schweinen nach dem Brühen, nach dem Entborsten und nach dem Abduschen (10 - 15 Sekunden mit 96° - 98° C heißem Wasser) und fanden eine erhebliche Reduzierung der Clostridienkontamination teilweise bis auf 0 zwischen der ersten und der letzten Untersuchungsstufe, während der Clostridiengehalt im Brühkessel im Verlauf von 500 Schlachtungen erheblich zunahm. SMART et al. (1979) fanden auf der Oberfläche der Oberschenkel in der Nähe des Anus bei 29 % der untersuchten Rinder, 66 % der untersuchten Schweine und 85 % der untersuchten Schafe *Cl. perfringens*.

Tab. 5: Prozentuale Verteilung von Clostridienfunden in Schlacht tierkörpern nach verschiedenen Autoren

<u>Schweine</u>	n=	Muskulatur	Lymphknoten	Herz	Blut	Milz	Leber	Niere	Darm-Lymph.	Darm	Bemerkungen
NARAYAN, 1967 b	100	46	8	-	-	22	14	21	25	-	Normal-schlachtung
NITSCHIPORUK, 1968	17	70,3	-	62,5	0	43,8	56,3	43,8	86,7	71,4	Krank-schlachtung
HOPPE, 1979	25 70 5	16 29 60	- - -	- - -	40 43 80	4 31 40	20 31 60	- - -	32 34 40	56 49 100	Normal-schlachtung Notschlachtung Tot-schlachtung
BAUER et al., 1981	ver. sch.	0	-	0	-	0	21,4	-	-	-	Normal-schlachtung Körperhülle 11,8 % Brühwasser 100 %
<u>Rinder</u>											
CANADA u. STRONG, 1964	100	-	-	-	-	-	12	-	-	-	Normal-schlachtung
NARAYAN, 1966 a	103 26	61,4 0	21,4 0	- -	- -	23,9 0	31,9 0	37,5 0	58,0 7,7	-	gefüllt ausgeräumt u. gef.
ELTER u. SCHARNER, 1968	182	0	-	-	-	0,55	9,3	1,1	15,9	-	Normal-schlachtung
NITSCHIPORUK, 1968	30	70	-	55,1	0	57,1	50	30	86,2	92,3	Krank-schlachtung
CYGAN et al., 1969	35 45	10 7	17 4	- -	- -	- -	60 33	- -	- -	-	gefüllt gehungert
SAGAJSKI, 1973	20 51	5 33,3	10 43,1	-	-	-	15 82,3	5 19,6	-	-	Normal-schlachtung Krank-schlachtung

6.2. Lebensmittelhygienische Bedeutung der Clostridien

Neben den in der AB.A ausdrücklich erwähnten, durch Clostridien hervorgerufenen Erkrankungen, nämlich Rauschbrand und Tetanus, spielen im Rahmen der Lebensmittelhygiene hauptsächlich zwei Spezies als mögliche Verursacher von Lebensmittelvergiftungen eine Rolle, nämlich *Cl. perfringens* und *Cl. botulinum*.

Daneben gibt es eine Reihe von Clostridien, die zwar beim Menschen keine Erkrankung auslösen, aber den technologischen Wert des Fleisches herabsetzen, indem sie dessen Haltbarkeit mindern und zum Verderb von Konserven beitragen können, da ihre Sporen die Erhitzung überleben können.

6.2.1. Clostridium perfringens

Laut einer Literaturübersicht über das Auftreten von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin zwischen 1968 und 1978 (SINELL und KOLB, 1981) wurden in diesem Zusammenhang nur drei Ausbrüche von *Cl. perfringens*-Intoxikationen beschrieben. Die tatsächliche Häufigkeit dürfte jedoch sehr viel höher liegen, da die Erkrankung normalerweise nicht schwer verläuft, nach 24 Stunden überstanden ist und ein Arzt häufig nicht konsultiert wird.

In den USA und England stellt diese Intoxikation die am zweithäufigsten von Lebensmitteln herrührende Erkrankung dar (LOTT, 1970).

Das durch *Cl. perfringens* Typ A-Intoxikationen hervorgerufene klinische Erscheinungsbild besteht aus hochgradiger Diarrhoe in Verbindung mit Leibschmerzen, aber meist ohne Erbrechen, beginnend etwa 8 - 14 Stunden nach Aufnahme des kontaminierten Nahrungsmittels, wobei die Erkrankung 12 - 24 Stunden andauert. Erkrankungen kommen gewöhnlich nur nach dem Verzehr von Nahrungsmitteln vor, die mehr als 10^7 Erreger/g enthalten. Normale Nahrungsmittel können 10^4 oder weniger Erreger/g enthalten, ohne daß sie klinische Symptome auslösen (NARAYAN, 1982). Nach LOTT (1970) sind unter den anlässlich von Lebensmittelvergiftungen isolierten *Cl. perfringens*-Stämmen solche mit sehr großer Hitzeresistenz der Sporen (bis zu

5 Stunden Kochtemperatur werden überlebt), aber auch solche mit normaler Hitzeresistenz. Bei den betroffenen Lebensmitteln handelt es sich meist um große Fleischstücke, Fleischgerichte in Soßen und Fleischpasteten. In kontaminiertem Rohfleisch wird bei der Zubereitung durch die Hitze die Begleitflora abgetötet. Gleichzeitig werden die Sporen zum Auskeimen stimuliert. In großen Fleischstücken sowie in großen Mengen Fleischsaucen herrschen beim Abkühlen lange Zeit hohe Temperaturen, die das Clostridienwachstum fördern; außerdem herrschen anaerobe Verhältnisse. Man sollte daher gekochte Fleischstücke und Fleischzubereitungen rasch auskühlen. Nach KATSARAS und HILDEBRANDT (1979) liegt der bedenkliche Temperaturbereich bei 57° C bis 15° C, die Abkühlung sollte jedoch bis auf mindestens 6° C erfolgen.

Der Mechanismus der Cl. perfringens-Intoxikation besteht in einer Vermehrung der aufgenommenen hohen Erregerzahl im Dünndarm mit nachfolgender Versporung, wobei die versporende Zelle Enterotoxin produziert, das durch Lysis der Zelle freigesetzt wird und zu einer Flüssigkeitsansammlung im Darm und davon ausgehender Diarrhoe führt. Das Enterotoxin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34.000 - 36.000 (KATSARAS und HILDEBRANDT, 1979). Laut NARAYAN (1982) soll das Toxin die Enzyme der Atmungskette im Darmepithel schädigen und so die Funktion der Natrium-Kalium-Pumpe zum Erliegen bringen, was wiederum zu einer unkontrollierten Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen führt.

6.2.2. Clostridium botulinum

Laut der Literaturübersicht von SINELL und KOLB (1981) über das Auftreten von Lebensmittelvergiftungen in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin zwischen 1968 und 1978 gab es in diesem Zeitraum 11 Ausbrüche von Botulismus mit 35 Einzelerkrankungen. Demnach wurden nur etwa 10 % der tatsächlich aufgetretenen Fälle in der Literatur erfaßt, denn aufgrund der Meldepflicht nach § 3 des Bundesseuchengesetzes wurden im Zeitraum jährlich zwischen 25 und 63, im Durchschnitt 43 Fälle registriert. Diese Zahlen dürften nur eine geringe Dunkelziffer aufweisen, da die Krankheit in der Regel so dramatisch verläuft, daß sie erkannt und gemeldet wird.

In den USA (ohne Alaska) traten zwischen 1899 und 1969 659 Ausbrüche mit 1.696 Erkrankungen bei 56,4 % Mortalität auf, 1970 - 1973 30 Ausbrüche mit 91 Erkrankungen und 23 % Mortalität und im Jahr 1974 20 Ausbrüche mit 30 Erkrankungen (SONNENSCHNEIN, 1980).

C1. botulinum bildet 7 immunologisch verschiedene Toxintypen (A - G), wobei jeder Stamm nach dem von ihm gebildeten Toxintyp klassifiziert wird. Von den Toxintypen sind aus lebensmittelhygienischer Sicht für den Menschen nur vier von Bedeutung, im Fleisch kommen nur zwei davon vor. Typ A ruft in der westlichen USA und in der Ukraine beim Menschen Erkrankungen hervor, wobei pflanzliche Nahrungsmittel, Fleisch und Fisch die Intoxikationsquellen sind, Typ B ist in den mittleren und östlichen USA, sowie in Nord- und Mitteleuropa verbreitet, die Intoxikationsquellen sind Fleisch und Fleischprodukte, insbesondere vom Schwein. Typ E und F wurde in Fischen und Fischerzeugnissen und Typ F in Leberpasteten nachgewiesen (SONNENSCHNEIN, 1980).

Das Ektotoxin wird intrazellulär im letzten Abschnitt des logarithmischen Bakterienwachstums synthetisiert und bei der Lysis der Zellen freigesetzt (SONNENSCHNEIN, 1980). Nach GROSSKLAUS (1976), zitiert nach SONNENSCHNEIN (1980), liegen die Schätzwerte für die minimale letale Toxindosis (Typ A) für den Menschen bei 0,003 µg nach Injektion, 0,15 µg/m³ nach Inhalation und 10 - 30 µg/l nach Ingestion.

Das Toxin hemmt die Freisetzung des Acetylcholins am neuronalen Teil der Synapsen und blockiert so die Übertragung nervöser Impulse. Nach einer Inkubationszeit von 24 - 48 (4 - 108) Stunden kommt es beim Menschen zu klinischen Symptomen, nämlich Nausea, Erbrechen und kolikartigen Bauchschmerzen, daneben Müdigkeit und allgemeine Schwäche. Danach treten Herabhängen der Augenlider, Doppelsehen, Schluck- und Sprechstörungen sowie Lähmung von Armen und Beinen bis hin zur Vierfachlähmung mit Ateminsuffizienz auf. Außerdem kommt es zu einer Augenmuskellähmung und zu allgemeiner Hyposekretion mit Blasenatonie und Tachycardie. Daneben gibt es noch eine mildere Verlaufsform, bei der Augensymptome und Mundtrockenheit im Vordergrund stehen (SONNENSCHNEIN, 1980).

6.2.3. Sonstige Clostridien von lebensmittelhygienischer Bedeutung

Neben *Cl. perfringens* und *Cl. botulinum* wurde laut LEVETZOW (1971) auch *Cl. bifermentans* in Großbritannien als Ursache von Lebensmittelvergiftungen beschrieben, wobei die befallenen Lebensmittel Fleisch und Kartoffeln waren und die Symptome denen einer *Cl. perfringens*-Intoxikation ähnlich gewesen sein sollen.

Vor allem *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans* und *Cl. butyrium*, aber auch *Cl. thermosaccharolyticum* spielen neben *Cl. perfringens* und *Cl. botulinum* eine Rolle als Verderbniserreger von Fleischkonserven, da hitzeresistente Sporen den Erhitzungsprozeß überleben und danach auskeimen können. Das Vorkommen und die Vermehrung von Clostridien in Fleischkonserven werden im wesentlichen durch den Anfangskeimgehalt, die Hitzekonservierung, die Lagertemperatur, pH- und a_w -Wert, Hemmstoffe und Konkurrenzflora bestimmt (LEISTNER, 1970).

6.3. Nachweis von Clostridien

Clostridien vermehren sich nur in mehr oder weniger sauerstofffreiem Milieu, das auch ein niedriges Redoxpotential aufweisen muß, um die Bildung von toxischem H_2O_2 zu verhindern, das wegen des Fehlens von Katalase von ihnen nicht abgebaut werden kann (HILDEBRANDT und KATSARAS, 1981).

6.3.1. Anaerobe Kulturverfahren

Die Herstellung anaerober Kulturverhältnisse kann durch die Evakuierung eines Anaerobiertopfes (ZEISSLER, 1930, zitiert nach HILDEBRANDT und KATSARAS, 1981) oder eines Brutschrankes (INAL und LEISTNER, 1969) mittels einer Pumpe unter Manometerkontrolle und anschließende teilweise oder vollständige Füllung mit inerten Gasen (CO_2 , H_2 , N_2 oder 90 % N_2 und 10 % CO_2) erfolgen. Eine wesentlich einfachere und sicher zu handhabende und weniger aufwendige Methode stellt insbesondere in Labors, die sich nicht so häufig mit der Anaerobierdiagnostik beschäftigen,

das von BREWER und ALLGEIER (1966) entwickelte sogenannte Gas Pak^R - System dar. Dabei werden zu bebrütende Platten oder Röhrchen in einen luftdicht verschließbaren Anaerobiertopf verbracht, in dessen Deckel sich innerhalb eines doppelten Metallgitternetzes mit 0,5 % Palladium überzogene Aluminiumkügelchen befinden, die als Katalysator dienen. Vor dem Verschließen des Deckels werden 10 ml Wasser in einen vorher luftdicht verschlossenen Einmalbeutel gefüllt, der eine H₂-produzierende Tablette aus Natriumborhydrid und eine CO₂-produzierende Tablette aus Natriumbicarbonat und Zitronensäure enthält. Der in dem Topf enthaltene Laftsauerstoff wird zur katalytischen Oxidation des produzierten Wasserstoffs verbraucht. Dieses System ist explosionsicher und einfacher zu verwenden als frühere elektrisch beheizte Katalysatortöpfe. COLLEE et al. (1972) und WEHRSPANN (1976) erzielten mit dem Gas Pak^R - System im Vergleich zu klassischen Anaerobiertöpfen bessere und zuverlässigere Ergebnisse.

Flüssiger Nährboden in Röhrchen kann, wie auch in der Bakteriologischen Fleischuntersuchung vorgeschrieben, unmittelbar vor der Beimpfung erhitzt und so von enthaltenem Sauerstoff befreit und danach mit erhitztem Paraffin bzw. Vaseline überschichtet werden. Dadurch läßt sich auch gleichzeitig das Wachstum von vielen Anaerobiern anhand der Gasbildung gut darstellen. Die Überschichtung mit Paraffin kann auch schon nach dem Abfüllen des Nährbodens vor dem Autoklavieren erfolgen, das Medium wird dann durch die vorher erwärmte Paraffinschicht hindurch beimpft.

Es ist auch üblich, den Nährmedien tierische Gewebe, wie z. B. Blut, Herz, Hirn oder Leber zuzufügen, da diese reduzierende Substanzen wie Sulfhydrylgruppen, Glutathion, etc. enthalten. Natriumthioglykolat, Cystin oder die Abbauprodukte von Glucose als Nährsubstrat wirken ebenfalls reduzierend (HILDEBRANDT und KATSARAS, 1981).

6.3.2. Flüssige Nährmedien

Im Rahmen der Clostridiendiagnostik haben sich verschiedene flüssige Nährböden zur Anreicherung von Clostridien oder auch zur Durchführung einer Keimzählung nach der MPN-Methode (LEVETZOW, 1971), bewährt.

Zu den nichtselektiven Medien, die das Wachstum von Clostridien durch Trübung und Gasbildung anzeigen, gehören die Leberbrühe (LB) nach KELCH (1955), die Leber-Leber-Bouillon nach TAROZZI (HOBRECHT, 1975) und das "Cooked Meat Medium" (CMM) nach ROBERTSON, das sich laut LEVETZOW (1971) auch ausgezeichnet zur langfristigen Aufbewahrung von Stämmen eignet. Die Thioglykolatbouillon, von BREWER entwickelt, muß bei der Bebrütung nicht mit Paraffin verschlossen werden, allerdings kann Thioglykolat schon in einer Konzentration von 0,01 % in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium das Wachsen von Clostridien behindern (HIBBERT und SPENCER, 1970). Die "Cooked-Meat-Thioglykolat-Bouillon" nach QUAGLIARO (1977), eine Mischung aus den beiden Grundnährböden, ist gut geeignet, um proteolytische und saccharolytische Stämme von *Cl. botulinum* zu unterscheiden und fördert außerdem das Wachstum und die Toxinbildung besser als CMM. Durch die sulfitreduzierenden Eigenschaften der Clostridien tritt eine Schwärzung im Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM; FREAME und FITZPATRICK, 1971) auf, die jedoch auch durch andere sulfitreduzierende Keime hervorgerufen werden kann. Deshalb schlugen die Autoren die Pasteurisierung des Probenmaterial vor der Beimpfung des Mediums vor. Auch bei der Beimpfung der vorher erhitzten LB im Rahmen der BU wird die Begleitflora mehr oder weniger stark abgetötet, wobei das Ansteigen der Zahl der falsch-positiven Reaktionen in der LB bei fallender Beimpfungstemperatur auffällt (FRIESS und BURDW, 1980; REUSSE, 1982).

Zur Unterdrückung der nichtclostridiellen Begleitflora werden auch verschiedene Hemmstoffe wie Sorbinsäure (KRAUS, 1962), Kristallviolett (NARAYAN, 1966 b) und verschiedene Antibiotika wie bei den festens Nährböden eingesetzt. LEVETZOW (1967) entwickelte das Natriumsulfit-Natriumacid-Thioglykolat (SAT)-Medium wobei Natriumacid als Hemmstoff für die ebenfalls sulfitreduzierende Begleitflora dient. FRIESS und BURDW (1980) erzielten mit diesem Medium in der BU schlechtere Ergebnisse als mit kochend heißer LB. BURDW (1981) bemängelt vor allem, daß die Zahl der falsch-positiven Reaktionen im Vergleich zur LB außerordentlich hoch ist und die Schwärzung des Mediums häufig erst nach 48 Stunden auftritt. Dagegen erzielte GEMMER (1981) mit dem SAT-Medium bessere Ergebnisse als mit kochend heißer LB, wobei sich auch hier ein großer Teil der Ansätze erst nach 48 Stunden schwarz färbte.

TAKACS (1971) verglich unter anderem CMM, modifiziertes CMM, KITT-TAROZZI-Leberbrühe und DRCM für die Untersuchung von Fleischkonserven auf *Cl. bifermentans*, *Cl. botulinum* A und B, *Cl. sporogenes* und *Cl. perfringens* und erzielte die besten Ergebnisse mit dem modifizierten CMM und der LB. HOBRECHT (1975) hält Leber-Leber-Bouillon nach TAROZZI für das geeignetste Nachweismedium für Gasödemerreger.

6.3.3. Subkultivierung auf festen Nährböden

Clostridien lassen sich bei stärkerem Befall der zu untersuchenden Proben direkt im Plattenausstrich nachweisen. In solchen Fällen, in denen mit einer niedrigen Befallsrate zu rechnen ist, wie z. B. bei frisch geschlachtetem Fleisch, werden zur weiteren Identifizierung von Erregern, die in flüssigen Anreicherungs-nährböden verdächtige Reaktionen zeigen (z. B. Trübung, Gasbildung oder Schwärzung), Subkulturen auf festen Nährböden angelegt.

Alle für den Menschen pathogenen Clostridien wachsen auf Frischblutagar (WILLIS, 1970). Auf DB-Platten mit 10 % Hammelblut bildet *Cl. perfringens* im Gegensatz zu anderen Clostridienarten keine Kolonienausläufer aus. Die 3 - 4 mm großen Einzelkolonien zeigen eine charakteristische doppelzonige, schießscheibenähnliche Hämolyse, das theta-Toxin ruft eine klare Zone um den Kolonienrand hervor, das alpha-Toxin eine sich daran anschließende partiell hämolytische Zone (HILDEBRANDT und KATSARAS, 1981).

Bereits 1924 wurde von WILSON und BLAIR ein Nährboden entwickelt, dessen Wirkungsweise auf den sulfitreduzierenden Eigenschaften der meisten Clostridien ähnlich wie beim SAT-Medium beruht. ANGELOTTI et al. (1962) entwickelten in Anlehnung an dieses Prinzip den Sulfit-Polymyxin B-sulfat-Sulfadiazin (SPS)-Agar, wobei der Antibiotikazusatz der Unterdrückung von ebenfalls sulfitreduzierender, gramnegativer Begleitflora (z. B. Salmonellen, Proteus, Pseudomonaden) dient. Dieser Nährboden ist im Gegensatz zu den folgenden nicht sehr selektiv für *Cl. perfringens*, daher lassen sich damit andere Clostridien auch nachweisen (SINELL und LEVETZOW, 1967). Eine Modifikation davon stellt der Trypton-Sulfit-Neomycin (TSN)-Agar (MARSHALL et al., 1965) dar, der speziell auf das

Wachstum von *Cl. perfringens* ausgerichtet ist, da dieses den hohen Gehalt an Sulfit, Polymyxin B und Neomycin toleriert und bei einer Bebrütung bei 46°C optimales Wachstum zeigt. Der SHAHIDI-FERGUSON-Perfringens (SFP)-Agar (SHAHIDI und FERGUSON, 1971) enthält neben Polymyxin B und Kanamycin auch Eigelb, das durch die von *Cl. perfringens* gebildete Lecithinase gespalten wird, was zu opaken Trübungszonen um die schwarzen Kolonien führt. HARMON et al. (1971) entwickelten aus dem SFP-Agar den Trypton-Sulfit-Cycloserin (TSC)-Agar, indem sie die Antibiotika durch D-Cycloserin ersetzten.

In ihrer Literaturübersicht berichteten HILDEBRANDT und KATSARAS (1981), daß auf dem SFP-Agar die höchsten Anwachsraten für *Cl. perfringens*, insbesondere bei hitzegeschädigten Keimen, festgestellt wurden, allerdings wuchsen auch einige andere lecithinasepositive Keimspezies darauf, daher wurde die Verwendung von TSC-Agar empfohlen. Bei der Verwendung von SPS-, TSN- und TSC-Agar als Fertignährboden muß mit einer bis um 2 Zehnerpotenzen verringerten Anwachsrate gerechnet werden.

Viele Clostridienarten, darunter *Cl. perfringens* und *Cl. botulinum*, sind in der Lage, Lecithinase zu bilden. WILLIS und HOBBS (1959) modifizierten den von ihnen entwickelten Laktose-Eigelb-Agar weiter zu einem Laktose-Eigelb-Milch-Agar. Die in der Eigelbemulsion enthaltenen Lipoproteine werden durch Lecithin stabilisiert. Bei Anwesenheit von Lecithinase kommt es zu einer Entmischung der Emulsion, was durch eine opaleszente Trübungszone um die Kolonien (NAGLER-Reaktion) sichtbar wird. Durch das Vorhandensein von Neutralrot als Indikator wird die Laktosefermentation z. B. bei *Cl. perfringens* durch einen rosaroten Hof sichtbar. Einige Clostridienarten bilden auf diesem Medium infolge Lipasebildung eine perlenartig glänzende Oberfläche, z. B. *Cl. botulinum* Typ A, B, C, E und *Cl. sporogenes*. Die proteolytische Aktivität von z. B. *Cl. botulinum* Typ A und B, *Cl. bifermentans* und *Cl. histolyticum* wird durch Bildung einer klaren Zone infolge Verdauung der Milch angezeigt.

6.3.4. Identifizierung von Clostridien

Die biochemischen Differenzierungsmerkmale der lebensmittelhygienisch wichtigsten Clostridien sind nach HILDEBRANDT und KATSARAS (1981) in

Tab. 6: Biochemische Differenzierung von Clostridien nach HILDEBRANDT und KATSARAS (1981)

	Cl. butyricum	Cl. perfringens	Cl. botulinum	Cl. sporogenes	Cl. bifermentans	Cl. histolyticum
Laktose	+	+	+	-	-	-
Saccharose	+	+	+	-	-	-
Glukose	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	-
Mannit	+	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	+	-
Nitratreduktion	-	+	-	+	-	-
Lackmuemilch	RG (sf ⁺)	sf	RG ⁺	GP ⁺	GP	GP
Gelatinase	-	+	+	+	+	+
H ₂ S-Bildung	-	+	+	+	+	+
Beweglichkeit	+	-	+	+	+	+
Hämolyse	-	+	+	+	+	+
Sulfitreduktion	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	-	+	+	+	+	-
Proteolyse	-	-	+/-	+/-	+	+

(+) unterschiedliche Angaben,

sf = Stormy fermentation, G = Gerinnung, R = Reduktion, P = Peptonisierung

Tab. 6 dargestellt. Die Abgrenzung zwischen *Cl. botulinum* und dem apathogenen *Cl. sporogenes* ist demnach schwierig, wobei allerdings durch den Toxinnachweis eine Abklärung möglich ist. Laut LEVETZOW (1971) ist die biochemische Differenzierung von Clostridien nicht mit der von anderen Keimen vergleichbar, da die Resultate irregulär sind und gelegentlich 2 - 3 mal wiederholt werden müssen, außerdem werden verschiedene Spezies in der Literatur nur sehr unzulänglich und bei verschiedenen Autoren differierend beschrieben. Nach HILDEBRANDT und KATSARAS (1981) reicht bei der routinemäßigen Untersuchung von sulfitreduzierenden Clostridien für die Identifikation von *Cl. perfringens* Typ A der Einsatz des Eigelb-Laktose-Agars von WILLIS und HOBBS in Verbindung mit einem Nitrit-Motilitäts-Medium aus. Dabei muß jedoch die Hälfte der Eigelbplatte mit einem *Cl. perfringens* Typ A-Antiserum bestrichen werden. Man sollte jedoch nicht vergessen, daß bei Lebensmittelvergiftungen schon toxinbildende Stämme von *Cl. perfringens* isoliert wurden, die keine Lecithinase bilden (SKJELKVÅLE et al., 1979).

Zur Schnellidentifikation von *Cl. perfringens* im Routinelabor eignet sich der sogenannte Reverse-CAMP-Test (BENTLER, 1981). Dabei wird auf Diagnostic Sensitivity Test (DST)-Agar mit Zusatz von 7 % Hammelblut ein Referenzstamm (*Streptococcus agalactiae*) in einem Strich aufgetragen und im rechten Winkel dazu der zu testende Stamm, wobei ein Abstand von 1 - 2 mm zwischen den beiden Ausstrichen liegen muß. In der Berührungszone beider Impfstriche kommt es durch Interaktion der beta-Hämolysen des Referenzstammes und der vom *Cl. perfringens* alpha-Toxin hervorgerufenen Hämolysen zu einer pfeilspitzartigen, vollständigen Aufhellung des Nährbodens. Für die Schnellidentifikation von *Cl. perfringens* eignet sich auch die saure Phosphatase-Reaktion nach UENO. (EISGRUBER und REUTER, 1984).

6.3.5. Toxinnachweis

Da *Cl. botulinum* aufgrund seiner Wuchsform und seiner Zellmorphologie von anderen Clostridien nicht abzugrenzen und eine biochemische Differenzierung im günstigsten Fall erst nach 4 Tagen möglich ist, suchten

HADLOK et al. (1968) nach einer Möglichkeit, über den Toxinnachweis aus positiv reagierender LB den Nachweis zu beschleunigen. Sie stellten fest, daß eine 24 Stunden alte Kultur von *Cl. botulinum* Typ A im Mäuseversuch bereits nach 7 Stunden typische Botulismuserscheinungen hervorrief, Typ B dagegen rief kaum Erscheinungen hervor. Trypsinbehandelte, 24 - 36 Stunden alte Typ B-Kulturen riefen jedoch nach 19 - 22 Stunden typische Erscheinungen hervor. Eine Behandlung einer Typ A-Kultur mit Trypsin schwächte zwar deren Toxizität ab, aber immerhin zeigten die Mäuse in kürzerer Zeit als trypsininaktivierte Typ B-Kulturen typische Erscheinungen. So kann innerhalb von 60 Stunden die Diagnose Botulismus auf jeden Fall gestellt werden, was eine Überschreitung der normalerweise 48 Stunden dauernden Untersuchung um 12 Stunden bedeutet.

Wie schwierig jedoch der Nachweis von Botulinumtoxin und erst recht des Erregers in der Praxis sein kann, zeigen die zwei folgenden Beispiele:

Im Zusammenhang mit 2 klinisch diagnostizierten Massenausbrüchen von Botulismus bei israelischen Rindern, denen ein Kraftfutter gefüttert worden war, das 10 % Geflügelkot enthielt, wurde, obwohl alle epidemiologischen Daten auch für Botulismus sprachen, nur in einem Fall aus der Leber eines verendeten Kalbes *Cl. botulinum* Typ D-Toxin nachgewiesen. Alle anderen kulturellen und toxikologischen Untersuchungen von Futter, Magen- und Darminhalt, Organen und Seren verliefen negativ (COHEN und TAMARIN, 1978).

In den Niederlanden traten auf 20 Bauernhöfen, auf denen Treber verfüttert wurde, schwere Verluste bei Rindern infolge von Botulismus auf. *Cl. botulinum* Typ B wurde im Treber nachgewiesen. Aus den Pansen und den Faeces der erkrankten Tiere wurde der Erreger ebenfalls isoliert (BREUKINK et al., 1978), aber das Toxin konnte nur in 4,5 % der Seren und in Panseninhalt, nicht aber in Leber, Niere, Muskulatur und Faeces nachgewiesen werden (HAAGSMA und TER LAAK, 1978).

6.3.6. Amtliche Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Clostridien

Laut AB.A zum Fleischbeschaugesetz sind mindestens je ein Stückchen der beiden Muskelproben in kochend heißer LB zu versenken und nach Über-

schichten mit stark erhitzter Vaseline mindestens 18 Stunden lang bei 37° C zu bebrüten. Bei Auftreten von Gasbildung ist zum Nachweis von Clostridien ein Ausstrichpräparat nach GRAM zu färben.

Dieses Verfahren ist jedoch nicht unumstritten (STOLLE und REUTER, 1980 a). Zwar benötigen nach LEVETZOW (1971) über 90 % der Clostridiensporen im Fleisch einen Hitzeschock um auszukeimen, wobei in der Literatur verschiedene Temperaturen und Zeiten (z.B. 30 Minuten bei 75° C, 5 - 10 Minuten bei 80° C) empfohlen werden. Ein solcher Hitzeschock genügt jedoch andererseits häufig, um vegetative Formen abzutöten. So werden alle vegetativen Keime von *Cl. perfringens* bei 70° C in 20 Minuten und bei 80° C in 10 Minuten abgetötet (HILDEBRANDT und KATSARAS, 1981). Laut KRAUS (1962) sind apathogene Clostridien in der Muskulatur jedoch nicht versport, daher können mit diesem Verfahren nur hitzeresistente Clostridien nachgewiesen werden. Seine Versuche mit Laborkulturen ergaben, daß die Gasbildung, insbesondere in vorher erhitzter LB, nach 24 Stunden häufig noch nicht oder nur unvollständig ausgebildet ist und daher auch die Bebrütungszeit zu knapp bemessen ist. Auch REUSSE (1982) konnte durch die Verlängerung der Bebrütungszeit der LB auf 48 Stunden die Nachweisbarkeit von Clostridien deutlich verbessern. Er erzielte auch mit 63° C heißer und mit zimmerwarmer LB mehr Nachweise, aber auch mehr falsch-positive Reaktionen (Gasbildung) als mit 80° C heißer LB. FRIESS und BURDW (1980) wiesen häufiger "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" nach, wenn sie die LB bei 80° C und nicht bei Kochtemperatur beimpften, dabei zeigte aber auch die 80° C heiße LB fast doppelt so häufig falsch-positive Reaktionen wie die kochend heiß beimpfte. HENNER (1980) wies dagegen mit kochend heißer LB etwas mehr Clostridien nach als mit kalter LB, auch die Anzahl der falsch-positiven Reaktionen in der kochend heißen LB war nur etwa halb so hoch wie in der kalten.

7. Derzeit zur Homogenisierung von Lebensmitteln gebräuchliche Methoden

Für die Homogenisierung von Lebensmittelproben in Verdünnungsflüssigkeit zum Zwecke der Keimzahlbestimmung werden heute drei verschiedene Gerätetypen verwendet:

- der sogenannte BLENDER oder MIXER - ein hochtourig arbeitendes Gerät, bei dem ein mit Messern ausgestatteter, auswechsel- und sterilisierbarer Mixbecher auf einen Motorteil aufgesetzt und die Probe darin zerkleinert wird (z. B. Ato-mix, Waring-Blendor, Osterizer-Blender)
- der ULTRA-TURRAX, ein hochtouriges Gerät, bestehend aus einem auswechsel- und sterilisierbaren stabförmigen Zerkleinerungskopf, der nach dem Aufstecken auf den Motorteil in die zu homogenisierende Probe eingetaucht wird
- der COLWORTH-STOMACHER, ein niedertourig arbeitendes Gerät. Die Probe nebst Verdünnungsflüssigkeit wird in einen Kunststoffbeutel verbracht, der in das Gerät eingehängt wird, wobei eine Gummileiste an der Öffnungsklappe den Beutel dicht verschließt. Zwei sich abwechselnd bewegende Metallpedale pressen die Probe gegen die Innenwand der Verschlussklappe und zerkleinern sie durch Druck- und Scherkräfte, wobei auch Keime aus nicht ganz zerkleinerten Probenteilen herausmassiert werden.

Verschiedene Autoren stellten vergleichende Untersuchungen über den feststellbaren Keimgehalt in Fleisch und Fleischprodukten nach Homogenisation im Stomacher und anderen Zerkleinerungsgeräten an.

SHARPE & JACKSON (1972), die den Stomacher entwickelten, fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Stomacher und einem "Ato-mix-Gerät", während TUTTLEBEE (1975) mit dem Stomacher 400 höhere Zahlen an *Staphylococcus aureus*, coliformen Keimen sowie aerob und anaerob wachsenden Keimen nachweisen konnte als mit dem "Ato-mix-Gerät". Beim Vergleich des Stomachers 400 mit einem Waring-Blendor stellten SCHIEMANN (1977) beim aeroben Gesamtkeimgehalt sowie GERATS und SNIJDERS (1978) beim Gesamtkeimgehalt und Enterobacteriaceengehalt keine signifikanten Unterschiede fest, während HARMON und KAUTTER (1979) bei der Untersuchung auf *Cl. perfringens* mit dem Waring-Blendor etwas höhere Keimzahlen, jedoch keine signifikanten Unterschiede fanden. EMSWILER et al. (1977) konnten bei der Untersuchung auf aeroben Gesamtkeimgehalt, coliforme Keime, fäkale coliforme Keime, *E.coli* und *Staphylococcus aureus* meist keine signifikanten Unterschiede zwischen einem Stomacher 400 und einem "Osterizer-Blender" nachweisen, ebenso wie SHARPE und HARSHMAN (1976)

bei ihren Untersuchungen auf *Cl. perfringens*, *Staphylococcus aureus* und Schimmelpilze. Die letzteren Autoren fanden jedoch bei Lebensmitteln mit einem Fettgehalt über 20 % etwas weniger Keime, was sich jedoch durch Zugabe von 1 % "Tween 80" zur Verdünnungsflüssigkeit vermeiden ließ. Sie stellten außerdem fest, daß die Verwendung des Stomachers für die Reisolierbarkeit von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* und *E.coli* weniger schädlich war als die Verwendung des Osterizer-Blenders.

BAUMGART (1973) verglich einen Stomacher 400 mit einem Ultra-Turrax und stellte keine signifikanten Unterschiede fest. Lediglich ein größerer Zerkleinerungsgrad der Proben wurde bei der Verwendung des Stomachers beobachtet, was zu Schwierigkeiten beim Pipettieren führte. Er empfahl daher die Anwendung von Pipetten mit größerer Öffnung, sowie fünfminütiges Stehenlassen des Homogenisats und anschließende Entnahme der Probe aus dem Überstand, wie von UNTERMANN (1967) beschrieben.

Die oben aufgeführten Autoren waren sich weitgehend über die Vor- und Nachteile des Stomachers einig. Die Anschaffungskosten für mehrere teure Mixbecher bzw. Ultra-Turrax-Stäbe entfallen, ebenso die aufwendigen Reinigungs- und Sterilisierungsarbeiten, da die Kunststoffbeutel nach Gebrauch mit Inhalt vernichtet werden. Dadurch kann die Zahl der pro Tag zu untersuchenden Proben erheblich gesteigert werden. Der Stomacher verursacht im Vergleich zu hochtourigen Geräten wesentlich weniger Lärm, die Temperatur der Probe erhöht sich während der Bearbeitung kaum und die Aerosolbildung mit evtl. pathogenen Keimen wird vermieden.

Die Nachteile des Stomachers sind einmal die etwas umständliche Handhabung der Kunststoffbeutel mit dem Probenmaterial (sie müssen in ein Gefäß, z. B. Bacherglas, gestellt werden), das gelegentliche Platzen der Beutel mit Auslaufen von infektiösem Material, sowie evtl. deren Perforation durch scharfkantige Probenteile, z. B. Knochensplinter.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

1.1. Probenmaterial

Zwischen April 1981 und August 1982 wurden an 510 BU-Einsendungen im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Nürnberg zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. Bei den eingesandten Proben von not- oder krankgeschlachteten Tieren handelte es sich, sofern sie vollständig waren, um folgende: je ein Stück Muskulatur aus dem Vorder- und Hinterviertel, einen Bug- oder Achsellymphknoten, einen Darmbeinlymphknoten, die Milz oder ein Stück davon, eine Niere sowie ein Stück Leber mit Leberlymphknoten und Gallenblase.

Die Untersuchungszeiträume und die Herkunft der Proben sind aus Abb. 1 zu ersehen.

Bei den in Untersuchungsserie 1 untersuchten 219 Probensätzen (von 123 Rindern, 26 Kälbern, 65 Schweinen, 2 Schafen und 3 Pferden) handelte es sich um frische Einsendungen, die zumeist am Vortag entnommen und in mit Styropor isolierten Faltkartons, teilweise ohne Zugabe von Kühlelementen, per Bahnexpress versandt worden waren.

In der Serie 2 wurden 40 BU-Probensätze von Rindern bearbeitet, die bereits an der BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg voruntersucht worden waren und danach abgeholt wurden. Es handelte sich dabei um salmonellenhaltige Proben, vermischt mit salmonellenfreien Blindproben. Sie waren dort bei 4⁰ C auf Schalen offen in Regalen gelagert worden. Für den Transport wurden die einzelnen Stücke separat in sterile Tüten verpackt.

In der Serie 3 wurden weitere 24 voruntersuchte, salmonellenhaltige Probensätze (20 von Rindern, 4 von Schweinen) untersucht. Sie stammten aus den BU-Stellen des Landesuntersuchungsamts (5), des Schlachthofs Nürnberg (8) und des Schlachthofs Schweinfurt (11). Die Proben aus Schweinfurt waren gekühlt per Bahnexpress versandt worden.

Abb. 1: Übersicht über Anzahl, Herkunft und Beschaffenheit der in der vorliegenden Untersuchung bearbeiteten BU-Einsendungen sowie über den Untersuchungszeitraum und die Probenaufbereitungs- und Untersuchungsmethodik

SERIE NR.	n=	HERKUNFT DER PROBENSÄTZE (BU-STELLE)	UNTERSUCHUNG AUF	AUFBEREITUNGSMETHODE			NÄHRBÜDEN/ANREICHERUNGSSYSTEM	
				a) STÜCKPROBEN	b) HOMOGENISAT	a) STÜCKPROBEN	b) HOMOGENISAT	
1 April/Mai Juli/Aug. 1981	219 (121) (98) f	LUA Nürnberg	Keimgehalt und Salmonellen im Ausstrich- verfahren	Direktausstr. v. M 1/2, Ni, Ln1/2, Mi, Ni, Le, Lein, Ga	0,1 ml aus M2 Mi+Ni +Le	NA (DB) BPL ENDO	NA DB BPLS XLD	
			Salmonellen im Sammelanreich.- verfahren	M1/2+ Ln1/2+ Mi+Ni Ga	M2+Mi+Ni+Le	PR 37° C BPL ENDO	SC 37° C MK 43° C BPLS XLD	
2 Juli/Sept. 1981	40 v	Schlachthof Nürnberg	wie oben	wie oben	wie oben	wie oben	wie oben	
				M2+Mi+Ni+Le von der Probeneroberfläche			SC 37° C MK 43° C BPLS XLD	
3 Jan. - Aug. 1982	24 v	LUA Nürnberg, Schlachthof Nürnberg, Schlachthof Schweinfurt	Salmonellen im Sammelanreich.- verfahren	M2+Mi+Ni+Le aus der Probentiefe				
				Le+Lein+Ga a. d. Probentiefe				
4 Juli/Aug. 1982	227 f	LUA Nürnberg	obligat anaerob wachsende gram- positive Stäb- chen	M 1	M 2	M 1	M 2	
						LB 80° C	LB 60° C, 10min bei Verdeckt Subkultur auf DB anaerob/aerob	

M1/2 = Muskulatur Vorder-
bzw. Hinterviertel
Ln1/2 = Lymphknoten Vorder-
bzw. Hinterviertel
Mi = Milz
Ni = Niere
Le = Leber
Le1n = Leberlymphknoten
Ga = Galle

NA = Nähragar
DB = 2% Dextrose-8lutagar
BPL = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Agar
ENDO = ENDO-Agar
BPLS = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Saccharose-Agar
XLD = Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

PR = Tetrathionatanreicherung
nach PREUSS
MK = Tetrathionatanreicherung
nach MÜLLER-KAUFFMANN
SC = Selenit-Cystin-Anreicherung

(f) = frisch eingesandt,
sofort angesetzt
(v) = voruntersucht,
vorselektiert, mehrere Tage
kühl gelagert

LB = Leberbrühe nach KELCH,
bei Beimpfung bei 60° C anschließend
noch 10 Minuten bei dieser Temperatur
im Wasserbad belassen

LUA = Landesuntersuchungsamt
für das Gesundheitswesen
Nordbayern

In der Serie 4 wurden wie in der Serie 1 frisch eingesandte Proben untersucht, und zwar die 2 Muskelproben von 227 Einsendungen (von 163 Rindern, 23 Kälbern, 39 Schweinen und 2 Pferden).

1.2. Material zur Aufbereitung der Proben sowie Kultivierung und Identifizierung der Keime

Zur Herstellung des Homogenisats wurde verwendet:

- ein Colworth Stomacher^R 80 (Seward & Co., London)
- Kunststoffbeutel (10 cm x 15 cm), steril (Seward & Co., London)
- 0,1 %iges Peptonwasser, mit Zusatz von 0,05 % Natriumchlorid, pH 7,0

Zur Bestimmung der Keimzahl wurde verwendet:

- Nähragar, bestehend aus 0,3 % Fleischextrakt (Oxoid Art.Nr. L 29), 1 % Pepton (Oxoid Art.Nr. L 34), 0,2 % Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat, 0,3 % Natriumchlorid und 1 % Agar
- Dextrose-Blutagar, wie vorstehend, jedoch mit 3 % Agar, 5 % Schafblut und 2 % Dextrose.

Zur Anreicherung, Kultivierung und Identifizierung von Salmonellen wurde verwendet:

- Tetrathionat-Kristallviolett-Anreicherungsbouillon nach PREUSS (Merck Art.Nr. 5173)
- Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon (Merck Art.Nr. 7709), einfach und doppelt konzentriert
- Tetrathionat-Anreicherungsbouillon nach MÜLLER-KAUFFMANN hergestellt gemäß dem Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen in Fleisch und Fleischerzeugnissen nach der Amtlichen Sammlung zu § 35 LMBG (N.N., 1980), einfach und doppelt konzentriert
- Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar nach KAUFFMANN (BPL-Agar; Merck Art.Nr. 7236)
- Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar, modifiziert (BPLS-Agar; Merck Art.Nr. 10747)
- Fuchsin-Laktose-Agar nach ENDO, Typ "S" (ENDO-S-Agar; Merck Art.Nr. 4043)

- Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar; Merck Art.Nr. 5287)
- Eisen-Zweizucker-Agar nach KLIGLER (KLIGLER-Agar; Merck Art.Nr. 3913)
- Salmonellen-Serum, omnivalent (Bundesgesundheitsamt, Berlin)
- Salmonellen-Faktoren-Seren (Behring-Werke AG, Marburg/Lahn)

Zur Anreicherung, Kultivierung und Identifizierung von Clostridien wurde verwendet:

- ein BBL-GasPak^R Anaerobiertopf (Becton Dickinson & Co.)
- BBL-GasPak^R Anaerobiersystem mit Entwicklung von Kohlendioxyd und Wasserstoff (Becton Dickinson & Co.; Art.Nr. 70304)
- Leberbrühe (Merck; Art.Nr. 5464) jeweils 5 ml in Röhrchen abgefüllt und bereits vor dem Autoklavieren mit weißer Vaseline DAB 7 überschichtet
- Eigelb-Pyruvat-Agar-Basis (Merck; Art.Nr. 10450) mit Zusatz von Eigelb-emulsion und Actidion (Fluka Art.Nr. 01810) laut Anleitung
- Cereus-Selektivagar nach MOSSEL (Merck; Art.Nr. 5267) mit Zusatz von Eigelbemulsion und Polymyxin B-Sulfat laut Anleitung
- Perfringens-Selektivagar nach ANGELOTTI (SPS-Agar, Merck; Art.Nr. 10235)
- Gelatineagar, bestehend aus 0,3 % Fleischextrakt (Dioxid Art.Nr. L 29), 1 % Natriumchlorid, 0,75 % Agar und 1 % Gelatine (Merck; Art.Nr. 4070)
- Nitrat-Bouillon (Merck; Art.Nr. 10204)
- GRIESS-ILOSVAYS Reagenz auf Nitrit (Merck; Art.Nr. 9023)
- Milch mit Zusatz von 5 % KUBEL-TIEMANNS Lackmuslösung (Merck; Art.Nr. 5314), jeweils 10 ml in Röhrchen abgefüllt

1.3. Ergebnisse von routinemäßig durchgeführten Untersuchungen

Die Unterlagen von 452 Salmonellennachweisen aus 61.219 Einsendungen an die BU-Stelle des Schlachthofs Nürnberg zwischen dem 1.1.1977 und 31.12.1982 wurden ausgewertet.

2. Methodik

Die Probenaufbereitungs- und Untersuchungsmethodik ist in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt.

2.1. Untersuchung von 219 BU-Einsendungen auf Keimgehalt und Salmonellen (Serie 1)

2.1.1. Verfahren nach Anlage 1 zur AB.A (Abb. 2)

Im Rahmen der BU nach AB.A wurde die Oberfläche der eingesandten Probe-
benteile einmal gründlich mit einem Bunsenbrenner abgeflammt. Nach
Abtragen der Oberfläche wurde unter Verwendung von keimfreien In-
strumenten aus der Mitte jeder Probe ein bohngroßes Stück heraus-
geschnitten und unter Verwendung von ENDO als zweiter Buntplatte und
PR als Salmonellenanreicherung auf ihren Keimgehalt und auf Salmonel-
len nach Anlage 1 zur AB.A untersucht. Zusätzlich wurden die Milz und
die Niere beim Schwein sowie die Milz beim Kalb auf je eine halbe DB-
Platte ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten und Anreicherungen
erfolgte mindestens für 18 Stunden bei 37° C.

Nach Abschluß der Bebrütung wurden die Platten auf allgemeines Keim-
wachstum sowie auf das Wachstum von Salmonellen und anderen Krank-
heitserregern untersucht.

Das Keimwachstum auf den Platten wurde wie folgt bewertet:

0	=	kein Keimwachstum
(+)	=	1 - 10 Kolonien
+	=	11 - 30 Kolonien
++	=	31 - 300 Kolonien
+++	=	mehr als 300 Kolonien

Beim Auftreten von salmonellenverdächtigen Kolonien wurde eine Objekt-
trägerprobeagglutination mit omnivalentem Salmonellenserum vorgenommen.
War diese positiv, so wurden die verdächtigen Kolonien nochmals zur Kon-
trolle mit verdünntem Normalserum und physiologischer Kochsalzlösung
verrieben. Von agglutinierenden Kolonien wurde aus dem Agglutinat eine
Subkultur auf ENDO-Agar angelegt und bebrütet. Danach wurde eine Salmo-
nellentypisierung mit monovalenten Faktorensereen durchgeführt. Nicht
vollständig typisierbare Isolate wurden auf KLIGLER-Agar nochmals sub-
kultiviert und dann endgültig typisiert.

2.1.2. Verfahren mit homogenisierten Proben (Abb. 3)

Nach gründlichem Abflammen der Proben wurden nach Abtragung der Probenoberfläche aus dem Probeninneren mit keimfreien Instrumenten ca. 10 g Muskulatur aus dem Hinterviertel sowie insgesamt 10 g Leber, Milz und Niere zu gleichen Teilen entnommen. Das Muskelstück wurde unter Verwendung einer keimfreien Schere und Pinzette entgegen der Faserrichtung zerkleinert und in 40 ml Peptonwasser versenkt, das sich in einem Kunststoffbeutel in einem Becherglas befand. Die Organproben wurden zusammen ohne Vorzerkleinerung in Peptonwasser versenkt. Anschließend wurde jeder Beutel separat in den Stomacher eingehängt und der Inhalt 90 Sekunden lang homogenisiert. Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß sich die homogenisierten Proben sehr schlecht pipettieren lassen, da nicht zerkleinerte Probenanteile die Pipettenspitzen verstopfen. Eine gleichmäßige Verteilung der festen und flüssigen Anteile des "Homogenisats" auf 2 Salmonellenanreicherungen ist auch nahezu unmöglich. Daher wurde der homogenisierte Beutelinhalt vor der weiteren Verwendung durch eine Schicht sterile Verbandsgaze filtriert. Die festen Bestandteile, die in der Gaze zurückblieben, wurden verworfen.

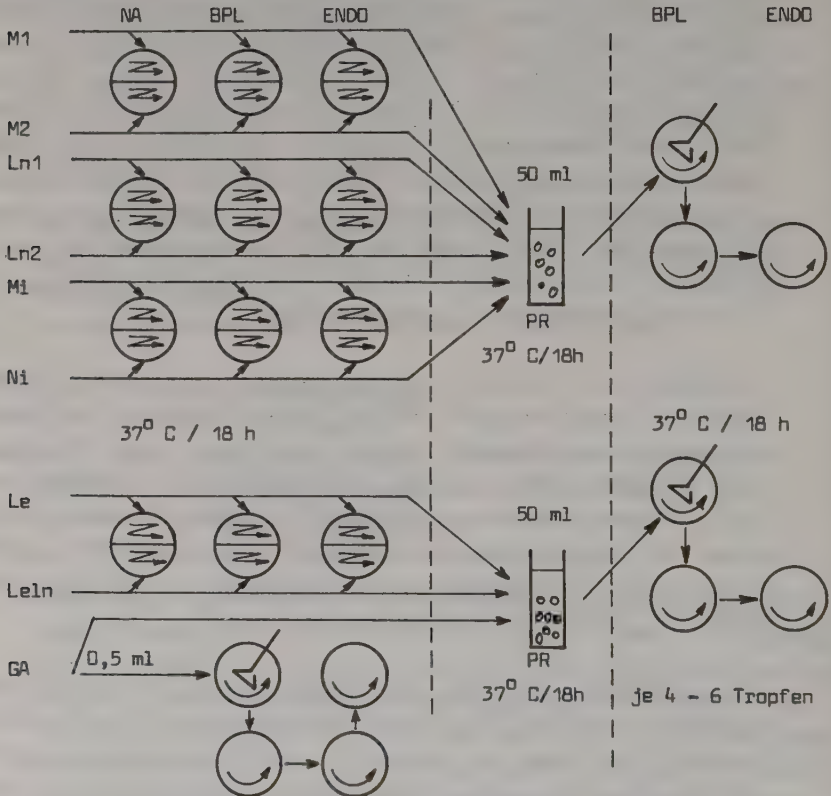
2 Tropfen (ca. 0,1 ml) des filtrierten Muskel- bzw. Organhomogenisats wurden auf je eine Platte NA, DB, BPLS und XLD aufgebracht und jeweils mit einem sterilen Glasspatel verteilt. Die Platten wurden für mindestens 18 Stunden, meist jedoch 20 - 22 Stunden bei 37° C bebrütet. Zu je 25 ml doppelt konzentrierter MK und 25 ml doppelt konzentrierter SC wurden 12,5 ml Muskelhomogenisat und 12,5 ml Organhomogenisat pipettiert. SC wurde bei 37° C für mindestens 18, meist jedoch 20 - 22 Stunden bebrütet. MK wurde bei 43° C ebensolang bebrütet.

Nach der Bebrütung wurde aus jeder Anreicherung ein Üsenausstrich (Üsen-durchmesser 4 mm) nach EDEL und KAPPELMACHER (1969) auf BPLS und XLD vorgenommen. Diese wurden dann nochmals 18 - 22 Stunden bebrütet. Nach Abschluß der Bebrütungszeit wurde das Keimwachstum, wie unter 2.1.1. beschrieben, bewertet, salmonellenverdächtige Kolonien wurden einer Probeagglutination unterzogen und gegebenenfalls typisiert. XLD wurde nach dem Ablesen noch 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen und danach nochmals begutachtet.

Abb. 2: Untersuchungen nach Anlage 1 AB.A

(Version a der Serien 1 und 2 nach Abb. 1)

Kontaminations-
frei entnommene
Tiefenprobe
(bohnengrößes
Gewebestück)



M1/2 = Muskulatur Vorder-
bzw. Hinterviertel
Ln1/2 = Lymphknoten Vorder-
bzw. Hinterviertel

M1 = Milz
Ni = Niere
Le = Leber
Le1n = Leberlymphknoten
Ga = Galle

Abb. 3: Untersuchungen mit modifizierter Probenaufbereitung durch Homogenisation

(Version b der Serien 1 und 2 nach Abb. 1)

Kontaminationsfrei
entn. Tiefenprobe

Kunststoffbeutel mit 40 ml
0,1 % Peptonwasser

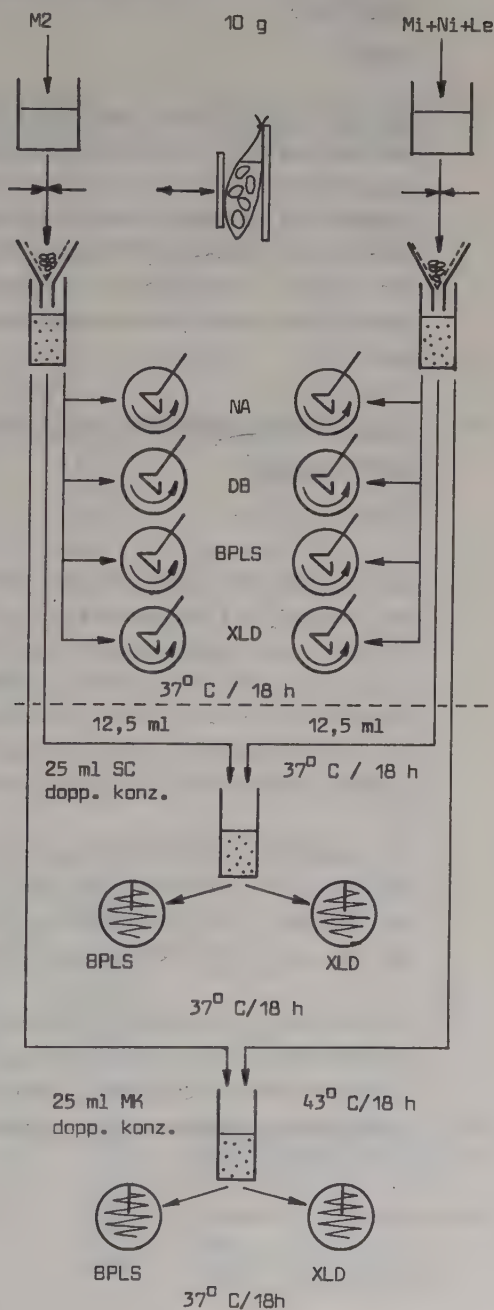
Homogenisation im
Stomacher, 90 sec

Filtration durch
sterile Gaze

Ausspateln von 0,1 ml

Anreicherung mit anschl.
Überimpfung

NA = Nähragar
DB = 2 % Dextrose-Blutagar
BPL = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Agar
ENDO = ENDO-Agar
BPLS = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Saccharose-Agar
XLD = Xylose-Lysin-Desoxycholat-
Agar
PR = Tetrathionatanreicherung
nach PREUSS
MK = Tetrathionatanreicherung
nach MÜLLER-KAUFFMANN
SC = Selenit-Cystin-Anreicherung



2.2. Vergleichende Untersuchung von 40 vorselektierten BU-Einsendungen auf Salmonellen

(Serie 2)

Da nach der Untersuchung der ersten 120 Probensätze befürchtet wurde, daß auch weiterhin zu wenige Salmonellen gefunden würden, um eindeutige Aussagen über die Vor- und Nachteile der einen oder anderen Methode machen zu können, wurden 40 vorselektierte Probensätze von der BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg sofort nach der Ankunft im Labor, wie unter 2.1. beschrieben, mit beiden Untersuchungsverfahren auf Salmonellen und zur Orientierung auf ihren allgemeinen Keimgehalt untersucht.

2.3. Vergleichende Untersuchung von 24 vorselektierten salmonellenhaltigen BU-Einsendungen

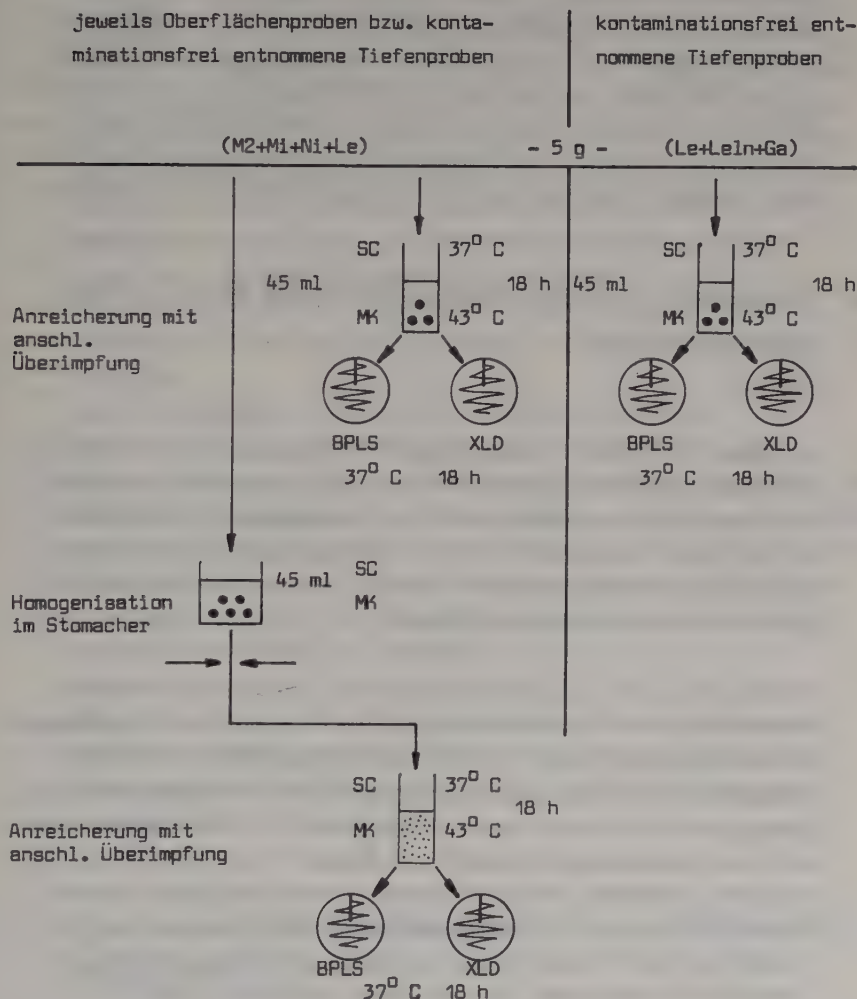
(Serie 3)

Nach Abschluß der vorangegangenen Untersuchungen stellte sich die Frage, inwieweit die Homogenisation, die Oberflächenkeime und die Mituntersuchung von Leberlymphknoten und Galle die Salmonellenreisolierbarkeit beeinflussen. Die bisherigen Untersuchungen ließen darauf keinen direkten Schluß zu, da neben unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden auch unterschiedliche, nicht vergleichbare Anreicherungsmedien und Untersuchungsmaterialien verwendet wurden.

24 vorselektierte BU-Probensätze von den BU-Stellen an den Schlachthöfen Nürnberg und Schweinfurt wurden sofort nach Ankunft im Labor ausgepackt und untersucht. Die Probensätze aus der BU-Stelle im Hause wurden sofort nach dem positiven Salmonellennachweis untersucht.

Wie aus Abb. 4 zu ersehen ist, wurden ohne vorheriges Abflammen je ca. 5 g Muskulatur, Milz, Niere und Leber von der Probenoberfläche mit sterilen Instrumenten entnommen, zerkleinert und auf 2 Gefäße mit je 45 ml einfach konzentrierter SC und 2 Gefäße mit je 45 ml MK verteilt. An-

Abb. 4: Untersuchung von homogenisierten und nicht homogenisierten Oberflächen- und kontaminationsfrei gewonnenen Tiefenproben aus 24 vorselektierten, salmonellenhaltigen BU-Einsendungen (Serie 3)



M 2 = Muskulatur
Hinterviertel
M1 = Milz
Ni = Niere
Le = Leber
LeIn = Leberlymphknoten
Ga = Galle

SC = Selenit-Cystin-Anreicherung
MK = Tetrathionatanreicherung
nach MULLER-KAUFFMANN
XLD = Xylose-Lysin-Desoxycholat-
Agar
BPLS = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Saccharose-Agar

schließlich wurde die Probenoberfläche einmal gründlich abgeflammt. Dann wurden mit sterilen Instrumenten nach Abtragen der Oberfläche aus der Probentiefe wiederum je ca. 5 g Muskulatur, Milz, Niere und Leber entnommen und wie oben auf 4 weitere Anreicherungsgefäße verteilt. Jeweils eine der doppelt angesetzten Anreicherungen wurde in einem Kunststoffbeutel im Stomacher 90 Sekunden lang homogenisiert und danach wieder in die Glasflasche zurückverbracht. Außerdem wurden ca. 5 g Leber und, soweit vorhanden, ein Leberlymphknoten und etwas Gallenflüssigkeit bzw. Gallenblasenwandung aus dem Probeninneren entnommen und auf je 45 ml SC und MK verteilt. Die Bebrütung erfolgte wie unter 2.1.2 beschrieben.

2.4. Untersuchung von 227 BU-Einsendungen auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen"

(Serie 4)

Im Rahmen der BU nach AB.A wurde bei 227 Einsendungen nach gründlichem Abflammen der Muskelstücke und Abtragen der Oberfläche mit sterilen Instrumenten aus dem Probeninneren ein bohngroßes Stück entnommen, mit der Schere zerkleinert und in einem Reagenzglas mit 80° C heißer, mit Vaseline überschichteter LB versenkt. Die LB wurde erst unmittelbar vorher aus dem Wasserbad genommen.

Gleichzeitig wurde ein weiteres Muskelstück von ca. 10 g entnommen. Dieses wurde nach Vorzerkleinerung mit der Schere in 40 ml Peptonwasser in einem Kunststoffbeutel versenkt und im Stomacher für 90 Sekunden homogenisiert. Aus dem Homogenisat wurden 0,5 ml entnommen und in ein Reagenzglas mit überschichteter LB pipettiert. Die 1 ml-Pipetten wurden nach entsprechender Umgraduierung umgekehrt, also mit der Spitze nach oben, verwendet, da sonst die Muskelfasern die Spitze verstopft hätten. Die LB stand in einem Wasserbad von 60° C und wurde erst 10 Minuten nach dem Beimpfen daraus entnommen. Der Ansatz erfolgte getrennt für die Muskulatur aus dem Vorder- und Hinterviertel.

Zeigte sich nach 22 - 24 Stunden Bebrütung bei 37° C in einem der Röhrchen Trübung mit/ohne Gasbildung, so wurde eine Subkultur auf 2 DB-Platten

angelegt, bei den mit Homogenisat beimpften Röhrrchen zusätzlich auf 2 Eigelb-Pyruvat-Agarplatten. Eine Platte wurde jeweils aerob bei 37° C 22 - 24 Stunden bebrütet, die andere anaerob in einem GasPak^R Topf.

Die aerob und anaerob bebrüteten Platten wurden bezüglich ihres Keimwachstums verglichen. Die anaerob bebrüteten Blutplatten wurden insbesondere auf Hämolysebildung hin untersucht, die Eigelb-Pyruvat-Platten auf Lecithinasebildung. Von mehreren repräsentativen Kolonien wurden Ausstriche angefertigt und nach GRAM gefärbt. Wurden nur auf den anaerob bebrüteten Platten plumpe grampositive Stäbchen gefunden, wurden von diesen Kolonien Subkulturen angelegt und der Versuch der Identifizierung von Cl. perfringens unternommen, in allen anderen Fällen wurde die Untersuchung als negativ abgeschlossen.

Die Identifizierung von Cl. perfringens erfolgte anhand folgender Merkmale:

doppelte Hämolyse auf DB; Lecithinase-Bildung auf Eigelb-Pyruvat-Agar bzw. Cereus-Selektiv-Agar nach MOSEL; nicht vorhandene Katalaseaktivität beim Verreiben mit Wasserstoffsuperoxyd; "stormy fermentation" in Lackmusmilch; Nitratreduktion in Nitratbouillon, überprüft durch Zugabe von GRIESS-ILDSVAYS Reagenz; Unbeweglichkeit im hängenden Tropfen aus der Nitratbouillon; Sulfitreduktion auf SPS-Agar; Gelatine-Verflüssigung auf Gelatineagar, sichtbar gemacht durch Über-schichtung mit 15%iger Sublimatlösung.

Konnten die nach der Gramfärbung verdächtigen Kolonien nicht als Cl. perfringens identifiziert werden oder ließen sie sich nicht weiter subkultivieren, so wurden sie als "obligat anaerob wachsende gram-positive Stäbchen" bezeichnet.

2.5. Auswertung von Salmonellenfunden aus 61.219 BU-Einsendungen aus einer Untersuchungsstelle

Die Unterlagen von 452 Salmonellenfunden aus 61.219 Einsendungen an die BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg von 1977 - 1982 wurden im Hinblick auf die Verteilung der Nachweise auf Fundstellen (Organe bzw. Organsysteme) und Salmonellenspezies ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Erkenntnisse

Die Homogenisierung von BU-Proben mit Hilfe des Stomachers hat sich als ein praktisches, rationelles Aufbereitungsverfahren bewährt. Wie bereits unter 2.2.2. erläutert, sind mit dem Stomacher homogenisierte Proben nicht leicht zu pipettieren, da bindegewebige Anteile und einzelne Muskelfasern die kleinen Pipettenöffnungen verstopfen. Organe lassen sich aufgrund ihrer Struktur feiner zerkleinern als Muskulatur. Es empfiehlt sich, letztere quer zur Faserrichtung mit der Schere etwas vorzuzerkleinern. Die größten Schwierigkeiten bereitete das Zerkleinern von Lymphknoten. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit des Untersuchungsganges wurden deshalb nach einigen Vorversuchen diese nicht mit in die Untersuchung einbezogen.

Zum Anlegen von Plattenausstrichen aus Salmonellenanreicherungen ist das Ausspateln mittels Glasspatel nicht geeignet, wenn man keine Verdünnungsausstriche mit demselben Spatel auf weitere Platten anfertigt, da sonst die Bakteriendichte zu groß ist, um verdächtige Kolonien zuverlässig zu erkennen. Daher wurden nach Vorversuchen, außer für das amtliche Untersuchungsverfahren nach AB.A, Ösenausstriche angefertigt, die einen guten Verdünnungseffekt hatten.

3.2. Vergleich der Ergiebigkeit von Stückproben- und Homogenisat- ausstrichen für die Quantifizierung des allgemeinen Keimgehalts bei 219 BU-Ein- sendungen

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen auf den allgemeinen Keimgehalt auf Nähragar in den 219 BU-Einsendungen sind schematisch in Abb. 5 dargestellt. Die Häufigkeit des Auftretens einzelner Keimzahlkombinationen und deren Abweichen von der Ideallinie ist dabei deutlich zu erkennen. Tierartliche Unterschiede waren bei den Werten nicht erkennbar. Auch spezifische Krankheitserreger, außer Salmonellen, waren

nicht nachzuweisen.

56,6 % der untersuchten Muskelproben erwiesen sich mit beiden Untersuchungsmethoden als keimfrei, 60 % im Homogenisat ausstrich und 79 % im Direktausstrich der Stückproben. Nur 7,3 % waren mit beiden Methoden stark keimhaltig. Die Homogenisierung der Muskelproben führte zu einer differenzierten Keimgehaltsabstufung. Viele im Direktausstrich als keimfrei oder schwach keimhaltig befundene Proben erwiesen sich in homogenisierter Form als stärker oder gar stark keimhaltig. Diese Tendenz war in beiden Untersuchungszeiträumen (Frühjahr und Sommer) vorhanden.

Die Organproben wiesen insbesondere im Sommer viel höhere Keimgehalte auf als die Muskulatur. 43,8 % der Proben erwiesen sich mit beiden Untersuchungsmethoden als stark keimhaltig. Keimfrei waren dagegen nur 7,3 % der Proben bei beiden Methoden, 14,2 % als Stückproben und 12,3 % als Homogenisate. Im Frühjahr, als die Organe weniger stark keimhaltig waren, wurden bei Homogenisaten etwas höhere Keimgehalte ermittelt. Dagegen war im Sommer, als die Proben meist stark keimhaltig waren, eine bessere Übereinstimmung der mit beiden Methoden ermittelten Werte festzustellen. Allerdings wurden hier mit den Stückproben etwas höhere Werte nachgewiesen.

Die Ausspatelung der Homogenisate führte meist zu gleich hohen Werten auf beiden nichthemmenden Nährböden, nur in Einzelfällen wurde ein etwas höherer Wert auf dem einen oder anderen Nährboden festgestellt.

3.3. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen auf Salmonellen

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen auf Salmonellen (Serie 1 - 3) sind in Tab. 7 - 12 sowie als Einzelergebnisse im Anhang in den Tabellen 18 - 20 dargestellt. In keiner der 3 Untersuchungsreihen konnten alle Salmonellennachweise mit einer Salmonellenaufbereitungs- und -untersuchungsmethode alleine geführt werden.

Keimzahlbewertung:

0 = keimfrei



= Abweichung vom erwarteten Wert um mehr als eine Stufe

schwach keimhaltig:

(+) = 1 - 10 Kolonien
+ = 11 - 30 Kolonien

stark keimhaltig:

++ = 31 - 300 Kolonien
+++ = mehr als 300 Kolonien

Keimzahl Muskulatur:

Stückprobe : Zahl der auf einer halben Nähragarplatte nach dem Ausstrich eines bohnen- großen Stücks Muskulatur aus dem Hinterviertel gefundenen Kolonien
Homogenisat : Zahl der auf einer Nähragarplatte nach dem Ausspäteln von 0,1 ml (1:5 verdünntem) Muskelhomogenisat aus dem Hinterviertel gefundenen Kolonien

Keimzahl Organe:

Stückprobe : Zahl der auf einer halben Nähragarplatte nach dem Ausstrich eines bohnen- großen Stücks Milz, Niere oder Leber gefundenen Kolonien, bewertet wurde jeweils der Maximalwert der 3 Organe

Homogenisat : Zahl der auf einer Nähragarplatte nach dem Ausspäteln von 0,1 ml (1:5 verdünntem) Mischhomogenisat aus Milz, Niere und Leber gefundenen Kolonien

3.3.1. Vergleich der Salmonellenausbeute bei Stückproben nach Anlage 1 zur AB.A und bei Homogenisaten eines reduzierten Probensatzes (Serie 1 und 2)

Es ergaben sich kaum Unterschiede in der Salmonellenausbeute bei der Anreicherung von Stückproben und Homogenisaten. Bei der Untersuchung der frisch eingesandten BU-Proben (Serie 1/Tab. 7) wurden im Homogenisat einmal mehr Salmonellen nachgewiesen als mit Stückproben, aber mit keiner Aufbereitungsmethode konnten alle Nachweise geführt werden.

Bei der Untersuchung der vorselektierten, gelagerten, zum Großteil salmonellenhaltigen Proben (Serie 2/Tab. 8), bei denen insbesondere die Organe meist einen starken allgemeinen Keimgehalt aufwiesen, ergaben sich keine Unterschiede. Von den 5 Fällen, in denen Salmonellen nur mit der herkömmlichen Methode nach AB.A nachgewiesen wurden, waren diese 4 mal nur in der Anreicherung des Leberkomplexes, der in der anderen Version nur unvollständig mituntersucht wurde, zu finden, in einem dieser Fälle zusätzlich im Direktausstrich der Galle. Berücksichtigt man diesen Faktor, so ist aufgrund dieser Ergebnisse die Anreicherung des reduzierten Probensatzes unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anreicherungsmedien überlegen, da sie bei geringerem Probenaufwand gleich gute Ergebnisse brachte.

Im Direktausstrich wurden in der Serie 1 keine Salmonellen nachgewiesen, in der Serie 2 dagegen einmal im Organhomogenisat, einmal im Direktausstrich der Muskulatur, zweimal im Lymphknoten und zweimal in der Galle. Diese Nachweise erfolgten jedoch gleichzeitig auch in der zugehörigen Anreicherung.

3.3.2. Vergleich der Salmonellenausbeute aus Stückproben und Homogenisaten bei gleichem Probenansatz

Beim Vergleich der Anreicherung von stark keimhaltigen Stückproben und Homogenisaten unter gleichen Voraussetzungen (Serie 3/Tab. 9) ergaben sich insgesamt kaum Unterschiede zwischen beiden Aufbereitungsmethoden.

Bei Aufgliederung der Ergebnisse fiel jedoch auf, daß bei Oberflächenproben bei Verwendung von MK bei 43° C öfter in den Homogenisaten Salmonellen nachweisbar waren.

3.3.3. Vergleich der Salmonellenausbeute bei Oberflächen- und Tiefenproben

Die Zahl der Salmonellennachweise in den stark keimhaltigen Oberflächenproben (20) der Serie 3 lag erheblich höher als in den zugehörigen Tiefenproben (12) wie aus Tab. 9 und 11 zu entnehmen ist.

3.3.4. Die Bedeutung der Leberkomplexanreicherung nach Anlage 1 zur AB.A

Aus den Ergebnissen der Serie 1 kann wegen der geringen Zahl an Salmonellenfunden keine Aussage über die Bedeutung der Leberkomplexanreicherung gemacht werden (Tab. 7). Bei den stark keimhaltigen Proben der Serie 2 wurden aus der Leberkomplexanreicherung häufiger Salmonellen nachgewiesen, als aus der Anreicherung I (Tab. 8). In den 5 Fällen, in denen Salmonellen nur mit der Methode nach Anlage 1 zur AB.A nachgewiesen wurden, waren diese in 4 Fällen nur in der Leberkomplexanreicherung zu finden, in einem Fall erfolgte dieser Nachweis auch im Direktausstrich der Galle.

Bei den Untersuchungen der Serie 3 (Tab. 9 - 11) waren die Salmonellen in der Anreicherungsversion "B", die der Leberkomplexanreicherung nach AB.A entspricht, wesentlich häufiger nachzuweisen, als in der Sammelanreicherung der Tiefenproben der Anreicherungsversion "A", die Leberlymphknoten und Galle nicht enthielt. Die Nachweishäufigkeit entsprach sogar der in den Oberflächenproben der Version "A".

3.3.5. Leistungsfähigkeit verschiedener Anreicherungsmedien

Bei den Untersuchungen der schwach keimhaltigen Proben aus der Serie 1 konnten bei den Homogenisaten des reduzierten Probensatzes alle Salmonellennachweise aus SC bei 37° C geführt werden, nur die Hälfte davon mit MK bei 43° C (Tab.7).

Aus dem gleichen Probensatz konnten dagegen in der Serie 2, in der die Proben stärker keimhaltig waren, die Salmonellennachweise nur mit MK bei 43° C in allen Fällen geführt werden (Tab. 8).

Bei der Untersuchung von stärker keimhaltigen Proben in der Serie 3 waren mit keinem der beiden Anreicherungsmedien alle Salmonellennachweise zu erzielen (Tab. 9, 10). Während bei der Untersuchung der Tiefenproben der Anreicherungsversion "A" sowohl bei Stückproben als auch bei Homogenisaten beide Medien gleich ergiebig waren (Tab. 9 a), zeigte sich bei der Untersuchung von Oberflächenproben eine Überlegenheit von MK bei 43° C, die bei homogenisiertem Probenmaterial stärker ausgeprägt war (Tab. 9 b). Auch bei der Untersuchung des Leberkomplexes (Version "B") war MK bei 43° C ergiebiger (Tab. 10).

Bei Verwendung des homogenisierten reduzierten Probenansatzes wurden in der Serie 1 (schwach keimhaltige Proben) mit SC bei 37° C einmal mehr (Tab. 7) und in der Serie 2 (stärker keimhaltige Proben) mit MK bei 43° C ebenso häufig Salmonellen nachgewiesen, wie bei Verwendung des vollständigen Probensatzes nach Anlage 1 zur AB.A in Form von grob zerkleinerten Stückproben mit PR bei 37° C (Tab. 8). Allerdings zeigte sich, daß PR bei 37° C den starken Begleitkeimgehalt in der Serie 2 nur ungenügend unterdrückte.

3.3.6. Leistungsfähigkeit verschiedener Plattierungsmedien

Beim Vergleich von BPLS mit XLD war, wie aus Tab. 12 a zu entnehmen ist, in 3 Untersuchungsserien keines der beiden Plattierungsmedien eindeutig überlegen, allerdings wurden mit BPLS etwas bessere Ergebnisse erzielt. Es zeigte sich aber, daß nur durch die Kombination der beiden Medien alle Salmonellennachweise möglich waren. Beim Vergleich von BPL mit ENDO war ENDO etwas überlegen (Tab. 12 b). Auch hier zeigte sich, daß die Kombination von 2 verschiedenen Nährböden die Nachweismöglichkeiten für Salmonellen verbesserte.

Die Verwendung von ENDO-Agar ist bei starkem Keimgehalt der Anreicherungsflüssigkeit, wie hier in der Untersuchungsserie 2, problematisch, insbesondere wenn mit dem Glasspatel ausgestrichen wird, da die Begleitflora nicht genügend gehemmt wird und vor allem *Proteus* sp. ungehindert schwär-

men können.

Die Anwendung von Üsenausstrichen zur Subkultivierung von Salmonellenanreicherungen erwies sich als zuverlässiges, plattensparendes Verfahren, das im Vergleich zum Ausspatelverfahren bei starkem Begleitkeimgehalt der Anreicherungsflüssigkeit das Ablesen der Platten wesentlich erleichtert.

Die Umstellung auf BPLS-Agar und XLD-Agar anstelle von BPL-Agar und ENDO-Agar im Routinelabor auch neben den hier beschriebenen Untersuchungen ist mit einem erhöhten Aufwand an Probeagglutinationen verbunden.

3.4. Ergebnisse der Untersuchung auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen"

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen sind in Tab. 13 und 14 dargestellt.

3.4.1. Auswirkung der Probenaufbereitungsmethode und der Beimpfungstemperatur auf die Nachweisraten

Die Untersuchungsergebnisse zeigen sehr deutlich, daß bei der Beimpfung von 80° C heißer LB mit ca. 1 g grob zerkleinerter Muskulatur mehr als doppelt so häufig "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" nachzuweisen waren, wie bei der Beimpfung von 60° C heißer LB, die nach dem Beimpfen noch 10 Minuten heiß gehalten wurde, mit 0,5 ml Muskelhomogenisat, das etwa 0,1 g Muskulatur bzw. deren Keime enthielt.

3.4.2. Auswirkung der Beimpfungstemperatur auf das Auftreten falsch-positiver Reaktionen in der Leberbrühe

In der bei 60° C mit Homogenisat beimpften LB traten, wie aus Tab. 13

und 14 zu ersehen ist, mehr als doppelt so häufig falsch-positive Reaktionen (Trübung mit / ohne Gasbildung) auf wie in der bei 80° C beimpften LB. So mußten bei 60° C Beimpfungstemperatur in 23,1 % der Fälle Subkulturen auf DB angelegt werden, was im Vergleich zu 80° C Beimpfungstemperatur mit 10,3 % falsch-positiven Reaktionen einen erheblichen Mehraufwand an Arbeit bedeutete. Die falsch-positiven Reaktionen waren hauptsächlich auf grampositive Kokken, aber auch auf grampositive Stäbchen zurückzuführen. Bei 60° C Beimpfungstemperatur waren in 5 Fällen sogar ausschließlich gramnegative Stäbchen für die Reaktion verantwortlich zu machen.

3.5. Erhebungen zur Ergiebigkeit der bisherigen Salmonellennachweisteknik nach AB.A im Einzugsgebiet der BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg

3.5.1. Stellenwert der beiden Salmonellenanreicherungen

Wie aus Tab. 15 zu ersehen ist, erfolgte im untersuchten Zeitraum die Mehrzahl der Salmonellennachweise aus der Leberkomplexanreicherung, beim erwachsenen Rind in ca. 80 % der Fälle, beim Schwein und besonders ausgeprägt beim Kalb dagegen weniger häufig. Beim erwachsenen Rind und beim Schwein wurden in ca. 47 % der Fälle die Salmonellen sogar ausschließlich in der Leberkomplexanreicherung nachgewiesen. Die Muskel-/Organanreicherung (Anreicherung I) hatte die größte Ergiebigkeit beim Kalb, gefolgt vom Schwein, während sie beim erwachsenen Rind nur weniger als die Hälfte der Salmonellennachweise ermöglichte.

3.5.2. Stellenwert der einzelnen Organe

In der Muskulatur der Schlachttiere fanden sich außer in einem Fall keine Salmonellen. Den größten Stellenwert als Salmonellenquelle hatte mit Abstand die Galle, gefolgt von Leberlymphknoten, Leber, Milz, Niere und Körperlymphknoten. Nur bei Kälbern wurden Salmonellen in der Niere fast so häufig gefunden wie in der Galle, dagegen kaum in

den Körperlymphknoten (Tab. 16).

Die weitere Auswertung der Nachweise im Direktausstrich des Leberkomplexes ergab, daß in 28 Fällen Salmonellen nur in der Galle gefunden wurden, dagegen in je 4 Fällen nur in der Leber bzw. den Leberlymphknoten.

3.5.3. Stellenwert des Direktausstriches

Wie aus Tab. 15 zu entnehmen ist, konnten nur 96 % der Salmonellen-nachweise über Anreicherungen geführt werden, d. h., 4 % der Salmonellenfunde waren nur im Direktausstrich nachzuweisen. Tab. 16 und 17 zeigen, daß auch in diesen Fällen die Mehrzahl der Nachweise aus dem Leberkomplex erfolgte. Keine der 6 Salmonellenspezies wurde nur über Direktausstriche nachgewiesen, sie waren in der Mehrzahl der Fälle in der Anreicherung zu finden (Tab. 17).

3.6. Erhebungen über die im Einzugsgebiet vorkommenden Salmonellenspezies (452 Salmonellenfunde aus 61.219 BU-Einsendungen an den Schlachthof Nürnberg)

Unter den 452 Salmonellenfunden fanden sich 40 verschiedene Spezies einschließlich 3 Varianten, 33 beim Rind, 22 beim Schwein und 13 beim Kalb. Die prozentuale Verteilung ist aus Tab. 21 im Anhang zu ersehen.

Beim Rind traten *S. typhi-murium*, *S. infantis*, *S. enteritidis* und *S. london* am häufigsten auf, beim Kalb *S. enteritidis*, *S. typhi-murium* und *S. infantis* und beim Schwein *S. typhi-murium*, *S. london*, *S. derby* (var.) und *S. panama*. Insgesamt lagen die beim Rind hauptsächlich vorkommenden Serotypen an der Spitze. 79,2 % aller Salmonellennachweise beschränkten sich auf 7 Spezies.

ERGEBNISSE DER SALMONELLENUNTERSUCHUNGSSERIE 1

Tab. 7: Vergleich der Homogenisatanreicherung H mit der Stückprobenanreicherung S (bisher nach AB.A vorgeschriebene Methode) bei 219 BU-Einsendungen (Serie 1)

Aufbereitungs- methode	Salmonellennachweise					Anreicherungs-	
	in beiden	nur in	Σ	nur in	in beiden	methode	
H	2	2	4	2	2	Selenit-Cystin 37° C	
				-		MÜLLER-KAUFFMANN 43° C	
S (Anreicherung I und II)	2	1	3	2	1	Anr. I	PREUSS 37° C
				-		Anr. II	
Σ	5						

Anreicherung I = Muskulatur + Körperlymphknoten + Milz + Niere

Anreicherung II = Leber + Leberlymphknoten + Galle

ERGEBNISSE DER SALMONELLENUNTERSUCHUNGSSERIE 2

Tab. 8: Vergleich der Homogenisatanreicherung H mit der Stückprobenanreicherung S (bisher nach AB.A vorgeschriebene Methode) bei 40 vorselektierten, z. T. salmonellenhaltigen BU-Einsendungen (Serie 2)

Aufbereitungs- methode	Salmonellennachweise					Anreicherungs-	
	in beiden	nur in	Σ	nur in	in beiden	methode	
H	10	5	15	-	12	Selenit-Cystin 37° C	
				3		MULLER-KAUFFMANN 43° C	
S Anreicherung I und II	10	5 ⁺⁾	15	3	6	Anr. I	PREUSS 37° C
				6 ⁺⁾		Anr. II	
Σ	20						

+) in den 5 Fällen, in denen Salmonellen nur bei Stückproben nachgewiesen wurden, traten sie in 4 Fällen nur in Anreicherung II auf.

ERGEBNISSE DER SALMONELLENUNTERSUCHUNGSSERIE 3

Tab. 9: Vergleich der Homogenisatanreicherung (H) mit der Stückprobenanreicherung (S) sowie zweier Anreicherungsmedien bei der Anreicherungsversion "A" (M2+Mi+Ni+Le) bei 24 vorselektierten, salmonellenhaltigen BU-Einsendungen

a) Tiefenproben

Aufbereitungs- methode	Salmonellennachweise					Anreicherungs- methode
	in beiden	nur in	Σ	nur in	in beiden	
H	9	2	11	3	5	Selenit-Cystin 37° C
				3		MULLER-KAUFFMANN 43° C
S		1	10	2	6	Selenit-Cystin 37° C
				2		MULLER-KAUFFMANN 43° C
Σ	12					

b) Oberflächenproben

Aufbereitungs- methode	Salmonellennachweise					Anreicherungs- methode
	in beiden	nur in	Σ	nur in	in beiden	
H	15	3	18	2	8	Selenit-Cystin 37° C
				8		MÜLLER-KAUFFMANN 43° C
S		2	17	4	6	Selenit-Cystin 37° C
				7		MÜLLER-KAUFFMANN 43° C
Σ	20					

Tab. 10: Vergleich zweier Anreicherungsmedien bei Stückproben (S) der Anreicherungsversion B* (Le+Leln+Ga)

Tiefenproben

Aufbereitungsmethode		Salmonellennachweise		Anreicherungs-methode
		nur in	in beiden	
S	20	3	11	Selenit-Cystin 37° C
		6		MULLER-KAUFFMANN 43° C

Tab. 11: Gesamtausbeute der Salmonellenachweise bei Berücksichtigung aller Probenentnahme- und Anreicherungsmodifikationen (Gegenüberstellung der Tabellen 9 a, 9 b, 10)

Anreicherungs-modifikation	Nachweis aus			Salmonellennachweise				
				gleichzeitig		nur mehreren Modifikationen, bei		
A (Tab. 9 a,b)	M2 Mi Ni Le	Tiefe	12	10	8	1	1	-
		Oberfläche	20					1
B (Tab. 10)	Le Leln Ga	Tiefe	20					1
				22				

M 2 = Muskulatur Hinterviertel

Mi = Milz

Ni = Niere

Le = Leber

Leln = Leberlymphknoten

Ga = Galle

Tab. 12: Übersicht über die Anzahl der Salmonellennachweise auf festen Nährböden in den 3 Untersuchungsserien nach Anreicherung

a) Sammelanreicherung von M2+Mi+Vi+Le
mit SC 37° C und MK 43° C

Nährböden	Serie 1 (n = 219)		Serie 2 (n = 40)		Serie 3 (n = 24)		Σ
	auf beiden	nur auf	auf beiden	nur auf	auf beiden	nur auf	
BPLS	6	-	26	-	94	12	138
XLD		-		1		6	133
Σ	6		27		112		145

b) 2 getrennte Anreicherungen laut Anlage 1 AB.A
mit PR 37° C

Nährböden	Serie 1 (n = 219)		Serie 2 (n = 40)		Σ
	auf beiden	nur auf	auf beiden	nur auf	
BPL	2	-	14	2	18
ENDO		2		5	23
Σ	4		21		25

SC = Selenit-Cystin-Anreicherung

MK = Tetrathionatanreicherung nach MULLER-KAUFFMANN

PR = Tetrathionatanreicherung nach PREUSS

BPLS = Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar

XLD = Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

BPL = Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar

ENDO = ENDO-Agar

Tab. 13: Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" aus 454 Muskelproben (227 BU-Einsendungen) bei unterschiedlicher Probenaufbereitung als Homogenisat H und als Stückprobe S und unterschiedlicher Temperatur der Leberbrühe bei der Beimpfung (60° C für 10 min./80° C)

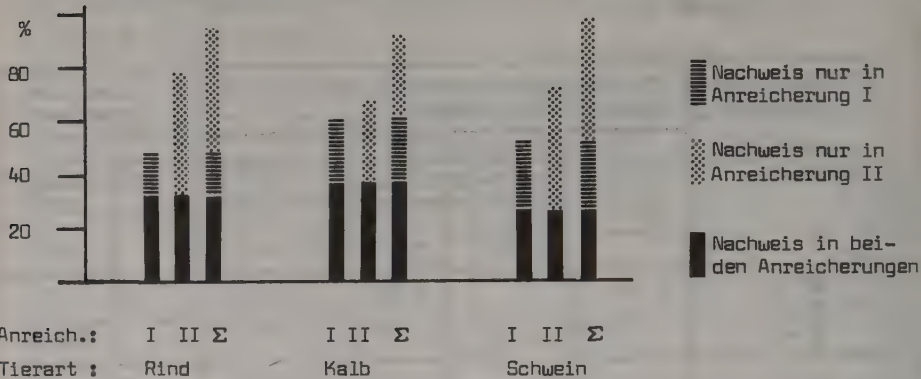
Probenaufbereitungsmethode	"Obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" nachgewiesen				falsch-pos. Reaktionen (Trübung mit/ohne Gasbildung)
	Σ	Clostridium perfringens		andere	
		in beiden	nur in	nur in	
H 60° C für 10 min	6 (5) 1,3 %	2 (1) 0,4 %	2 (2) 0,4 %	2 (2) 0,4 %	105 23,1 %
S 80° C	14 (10) 3 %		9 (7) 2 %	3 (2) 0,7 %	47 10,3 %

Werte in Klammer: Zahl der BU-Einsendungen, aus denen die Einzelnachweise stammen

Tab. 14: Ursachen der bei der Untersuchung von 454 Muskelproben aufgetretenen Reaktionen der Leberbrühe (Trübung mit / ohne Gasbildung), die nicht auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" zurückzuführen waren (falsch-positive Reaktionen)

Probenaufbereitungsmethode Beimpfungstemperatur	Σ	Kokken	Kokken + grampos. Stäbchen	grampos. Stäbchen	ausschl. gramneg. Stäbchen
Homogenisat 60° C 10 min	105	93	5	2	5
Stückprobe 80° C	47	40	5	2	-

Tab. 15: Verteilung von 452 Salmonellenfunden aus 61.219 Einsendungen an die BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg auf Tierarten, vorgeschriebene Anreicherungs-systeme nach AB.A und Nachweise nur im Direktausstrich (Zeitraum 1977 - 1982)



Salmonellennachweis in Anreicherungen	Rind	Kalb	Schwein	Pferd ⁰⁾ Schaf ⁺)	Σ
nur in I	41 16,3 %	20 24,7 %	30 25,4 %	1 ⁰⁾	92 20,3 %
nur in II	117 <u>46,6 %</u>	25 30,9 %	55 <u>46,6 %</u>	1 ⁺)	198 43,8 %
in I und II	82 32,7 %	30 37,0 %	32 27,1 %		144 31,9 %
Σ I + II	240 95,6 %	75 92,6 %	117 99,1 %	2	434 96,0 %
nur im Direktausstrich	11 4,4 %	6 7,4 %	1 0,9 %		18 4,0 %
Σ n	251	81	118	2	452

I = Muskulatur aus dem Vorder- und Hinterviertel, Lymphknoten aus dem Vorder- und Hinterviertel, Milz und Niere
 II = Leber, Leberlymphknoten und Galle

Tab. 16: Übersicht über die Verteilung der Einzelnachweise von Salmonellen im Direktausstrich der Organe bei 452 Salmonellen nachweisen aus 61.219 Eisaufnahmen an die BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg (Zeitraum 1977 - 1982)

Tierart	gleichzeitig in der zugehörigen Anreicherung nachgewiesen				in der zugehörigen Anreicherung nicht nachgewiesen				in keiner der beiden Anreicherungen nachgewiesen				insgesamt			
	Rind	Kalb	Schw.	Σ	Rind	Kalb	Schw.	Σ	Rind	Kalb	Schw.	Σ	Rind	Kalb	Schw.	Σ
Muskulatur Vorderviertel										1		1		1		1
Muskulatur Hinterviertel																
Lymphknoten Vorderviertel	1		1	2		1	1	2	1		1	2	2	1	3	6
Lymphknoten Hinterviertel	2		1	3		1	1	2	1		1	2	3	1	3	7
Milz	1	2	(4)	(7)	1			1		2		2	2	4	4	(10)
Niere		3	1	4					1	(4)		5	1	(7)	1	(9)

Leber	3		2	5			2	2	(4)	(4)		(8)	(7)	4	4	(15)
Leberlymphknoten	3	1	(4)	(8)			2	2	(4)	2		(6)	(7)	3	6	(16)
Galle	(9)	(4)	(12)	(25)	2	3	3	(8)	(6)	2		(8)	(17)	(9)	(15)	(41)

○ = relativ gehäuftes Auftreten



= sehr starke Abweichung von allen übrigen Werten

Tab. 17: Verteilung von 18 von insgesamt 452 Salmonellenisolaten aus 61.219 Einsendungen an die BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg (Zeitraum 1977-1982), die nur im Direktausstrich und nicht über Anreicherungen erfolgten, auf Salmonellenspezies, Tierarten und Organe

Salmonellentyp	Tierart	M1	M2	Ln1	Ln2	Mi	Ni	Le	Le-ly	Ga	Σ
S. typhi-murium	Rind				+			+			7 (84)
"	"							+	+	+	
"	"							+			
"	"								+		
"	"							+	+	+	
"	"						+			+	
S. enteritidis	"									+	2 (22)
"	"								+		
S. abortus bov.	"			+							1 (5)
S. brandenburg	"									+	1 (3)
S. enteritidis	Kalb					+	+	+	+	+	5 (26)
"	"					+	+	+	+	+	
"	"	+									
"	"						+				
"	"							+			
S. infantis	"						+	+			1 (15)
S. thompson	Schwein			+	+						1 (3)
	Σ	1	-	2	2	2	5	8	7	8	

M 1/2 = Muskulatur Vorder-

bzw. Hinterviertel

Ga = Galle

Ln 1/2 = Lymphknoten Vorder-

bzw. Hinterviertel

Mi = Milz

Ni = Niere

Le = Leber

Lein = Leberlymphknoten

() = Gesamtzahl der Isolate dieser Salmonellenspezies bei dieser Tierart (aus Anreicherungen und Direktausstrichen)

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1. Allgemeine Erkenntnisse

Da bei der Verwendung eines Stomachers zur Homogenisierung von Proben keine Reinigungs- und Sterilisierarbeiten anfallen, weil die verwendeten Kunststoffbeutel nach Gebrauch samt Inhalt vernichtet werden und das Gerät einfach zu handhaben ist, ist es für die Untersuchung von großen Mengen an Routineproben gut geeignet; auch die Lärmbelastigung hält sich in Grenzen. Diese Vorteile wurden von allen Autoren, die das Gerät in vergleichenden Untersuchungen verwendeten, bestätigt (siehe Kap. B 7). Das etwas umständliche Umgehen mit den Kunststoffbeuteln, die in ein Becherglas oder ähnliches gestellt werden müssen, erwies sich auch in der vorliegenden Untersuchung als etwas nachteilig, allerdings kann man sich schnell an einen rationellen technischen Umgang mit den Beuteln gewöhnen. Die für den Homogenisierungsvorgang selbst benötigte Zeit fällt nicht ins Gewicht, da in der Zwischenzeit andere Proben gewonnen oder Homogenisate ausgestrichen werden können. Die Tatsache, daß das Homogenisat hier vor der weiteren Untersuchung filtriert werden mußte, mag diese Aufbereitungstechnik als sehr aufwendig erscheinen lassen. Dieses wurde jedoch nur deswegen getan, um vergleichbares Material für 2 Salmonellenanreicherungen zu erhalten, da die festen Bestandteile sich kaum gleichmäßig verteilen lassen.

In der Praxis wäre es dagegen möglich, die Beutel vor der Verimpfung auf Plattierungsmedien einige Minuten stehen zu lassen und dann aus der homogenen Phase, wie von UNTERMANN (1967) beschrieben, mit der Pipette einige Tropfen für den Plattenausstrich zu entnehmen. Man könnte sogar soweit gehen, einen Glasspatel von standardisierter Größe nur kurz einzutauchen und mit der daran hängenbleibenden Flüssigkeit die Platten zu bestreichen. Der Rest könnte in toto in eine Salmonellenanreicherung überführt werden, bzw. diese könnte hinzugefügt werden, wobei die Bebrütung im aufgehängten Beutel erfolgen könnte, wie von PIETZSCH (1982) vorgeschlagen.

Die Umstellung auf neue Salmonellen-Plattierungsmedien war mit einem vermehrten Aufwand an Probeagglutinationen verbunden. Nach EDEL und KAMPELMACHER (1969) ist das Suchen und Identifizieren verdächtiger Kolonien sehr zeitaufwendig und somit ein limitierender Faktor. Daher ist die Erfahrung des Untersuchers mit einem bestimmten Nährboden sehr wichtig. Dies sollte bei einer Umstellung der Untersuchungsmethodik im Rahmen der BU bedacht werden, d. h. der Untersucher sollte im Rahmen des Möglichen auch weiterhin Plattierungsmedien verwenden können, die ihm vertraut sind und die sich bewährt haben, wie z. B. BPL.

2. Vergleich des allgemeinen Keimgehalts von BU-Probensätzen

Bei der Homogenisierung der im Rahmen der BU entnommenen Probensätze besteht die Gefahr, daß bei nicht sorgfältig durchgeführter Oberflächendeckontamination und Entnahmetechnik Oberflächenkeime in das Homogenisat gelangen und fälschlich zu höheren Keimgehalten führen. Dagegen können unter Umständen beim Direktausstrich Oberflächenkeime weniger ins Gewicht fallen, wenn nur der Teil, der aus dem Kern der Probe stammt, ausgestrichen wird. Dies bestätigt REUSSE (1982) anhand einer kleinen Serie von Untersuchungen, die ergaben, daß in Muskelproben im Gegensatz zum Direktausstrich nach Homogenisierung stets ein mehr oder weniger starker Keimgehalt vorhanden war. Aus diesen Überlegungen wurden Körperlymphknoten im Rahmen dieser Arbeit nicht mit untersucht, da sich deren Oberflächen schlecht entkeimen lassen (MARX und REUTER, 1976).

Der hohe Anteil an Muskelproben, die sowohl im Direktausstrich, als auch nach der Homogenisierung keimfrei waren, bewies im Gegensatz zu den oben aufgeführten Untersuchungen von REUSSE (1982), daß es im Routinebetrieb durchaus möglich ist, die Proben kontaminationsfrei zu entnehmen. Die Gegenüberstellung der mit beiden Methoden festgestellten Keimgehalte zeigte jedoch eine Tendenz zu stärkeren Keimgehalten bei den Homogenisaten. Dieses fiel besonders bei einigen Proben auf, die im Direktausstrich keimfrei waren, bei der Homogenisierung aber sogar teilweise einen starken Keimgehalt aufwiesen, was durch die unregelmäßige Verteilung der Keime in der Probe erklärt werden kann, denn die homogenisierte Probe war nicht identisch mit der Ausstrichprobe. Im Direktausstrich könnte eine weniger keimhaltige Stelle erfaßt worden sein, dagegen ein

Bakterienherd im Zentrum der Probe nicht. Bei der Homogenisierung dagegen wäre der Bakterienherd gleichmäßig verteilt worden. Andererseits kam es kaum vor, daß im Direktausstrich viel höhere Werte ermittelt wurden als aus Homogenisaten. Dieses ist dadurch zu erklären, daß eine Probe, die an einzelnen Stellen viele Keime enthielt, kaum ein keimfreies oder keimarmes Homogenisat ergeben konnte.

Die Keimgehalte der Organe lassen sich nicht so gut vergleichen, da einerseits ein Mischhomogenisat untersucht wurde, andererseits Einzelorgane ausgestrichen wurden. Es wäre schwierig, aufgrund der nur semi-quantitativen Keimzahlbestimmung daraus einen Durchschnittswert zu errechnen, der mit den Werten aus dem Homogenisat vergleichbar ist. Daher wurde zum Vergleich der Maximalwert der drei Direktausstriche gewählt.

Die Abweichungen der Keimgehaltswerte nach beiden Seiten sind verständlicherweise aufgrund der verschiedenen Bewertungssysteme größer. Trotzdem waren eindeutige Tendenzen zu erkennen. Im Frühjahr, als die Proben weniger stark keimhaltig waren, fanden sich bei den Homogenisaten höhere Werte, ähnlich wie bei Muskelproben. Dagegen näherten sich die mit beiden Verfahren ermittelten Werte im Sommer einander an, da hier der Keimgehalt höher war und wohl dadurch auch die Keime gleichmäßiger verteilt waren. Die hier bei den Stückproben teilweise etwas höheren Werte könnten dadurch zu erklären sein, daß ein höherer Wert in einem Organ, der ja zum Vergleich herangezogen wurde, bei der Homogenisierung zusammen mit zwei anderen Organen reduziert werden kann.

Die Homogenisierung von BU-Proben mit dem Stomacher ermöglicht bei kontaminationsfreier Arbeitstechnik im Vergleich zum Direktausstrich eine genauere Aussage über den Keimgehalt. Sie ist außerdem besser zu standardisieren und nicht so personenabhängig wie die Direktausstrichtechnik.

3. Vergleichende Untersuchungen auf Salmonellen

Im Rahmen der Untersuchungen wurde auf den Einsatz einer Voranreicherung bewußt verzichtet, da diese nur bei einer Mindestbebrütungszeit von 18 Stunden (MULINDWA und PIETZSCH, 1979) sinnvoll erscheint. Auch eine zweite Abimpfung aus der Anreicherung nach 48 Stunden Bebrütungszeit

wurde nicht in Erwägung gezogen, da beide Methoden die Untersuchungsdauer um einen Tag verlängert hätten, was nach Ansicht der "Arbeitsgruppe Mikrobiologische Fleischuntersuchung" des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (REUTER, 1980) in der Praxis für die Durchführung der BU zu einschneidende Konsequenzen hätte und daher nicht durchzusetzen wäre.

REUSSE et al. (1975) halten eine Voranreicherung im Rahmen der BU für unnötig, da sie Salmonellen in frischen Schlachttierkörpern nicht als vorgeschädigt ansehen. Sie erzielten auch bei BU-Proben durch eine zweite Abimpfung aus der Salmonellenanreicherung nach 48 Stunden Bebrütungsdauer im Gegensatz zu anderen Untersuchungsmaterialien keine Verbesserung der Salmonellenausbeute. Bei der Nachuntersuchung von Pferdefleisch im Zusammenhang mit einer Lebensmittelvergiftung erzielten sie allerdings nach 48 Stunden etwas mehr Salmonellennachweise. Auch FAGERBERG und AVENS (1976) halten eine Voranreicherung für die Untersuchung von frischem Fleisch für unnötig.

Da nach Abschluß der Untersuchungsserie 1 zu befürchten war, daß sowohl aufgrund der Gesamtprobeneingänge an das Landesuntersuchungsamt Nürnberg als auch aufgrund der relativ geringen Salmonellennachweisraten im eingesandten Material Aussagen über die Effektivität der einen oder anderen Methode auch nach großen Untersuchungsserien nicht möglich wären, mußte auf sicher salmonellenhaltiges Untersuchungsmaterial zurückgegriffen werden. Die künstliche Infektion von Untersuchungsmaterial ist zwar ein übliches Verfahren (EDEL und KAMPELMACHER, 1969; PIETZSCH et al., 1975) z. B. bei Kotproben, Hackfleischproben und Eipulver, jedoch wäre die künstliche Kontamination von größeren Muskel- und Organstücken schwierig gewesen, da man die Verteilung von Salmonellen in kompakten Muskel- und Organstücken wohl kaum so wie in originären Proben reproduzieren kann, wodurch kein sinnvoller Vergleich zwischen Stückproben und Homogenisaten möglich wäre. Aus diesem Grund wurden amtlich voruntersuchte Probensätze, die zum Großteil als salmonellenhaltig befunden worden waren, noch einmal angelegt. Diese Proben wiesen allerdings einen starken Allgemeinkeimgehalt auf, bedingt durch die mehrtägige Lagerung bis zum Abschluß der amtlichen Untersuchung und teilweise auch durch den anschließenden Versand. Dieses muß jedoch nicht als Nachteil angesehen

werden, da auch im Rahmen der regulären BU landesweit mit ungünstigen Bedingungen beim Versand von Proben zu rechnen ist.

Die Untersuchungen der Serie 1 und 2 zeigten deutlich, daß trotz der Verwendung eines reduzierten Probensatzes bei Homogenisierung des Probenmaterials und Verwendung anderer Anreicherungs-systeme die Salmonellenausbau-te vergleichbar hoch war wie bei der Untersuchung von Stückproben in PR bei 37° C nach der bisher vorgeschriebenen Methode nach AB.A.

Da bei gleichem Probensatz und gleicher Anreicherungstechnik die Homogenisierung der Proben im Vergleich zu grob zerkleinerten Proben in der Untersuchungsserie 3 kaum eine Verbesserung des Salmonellennachweises erbrachte, hatte möglicherweise auch in den Untersuchungs-serien 1 und 2 die Homogenisierung auf das Ergebnis keinen nennenswerten Einfluß. Dieses ist erstaunlich, da man von einer ungleichen Verteilung von Salmonellen in Schlachttierkörpern ausgehen muß (REUSSE et al., 1975), wobei zu erwarten ist, daß eine möglichst intensive Zerkleinerung des Probenmaterials die Nachweisrate von Salmonellen verbessert (PIETZSCH, 1981).

Aus den Oberflächenproben der Untersuchungsserie 3 wurden sehr viel häufiger Salmonellen nachgewiesen als aus den Tiefenproben, wobei deutliche Zusammenhänge zwischen den Nachweisen aus den Oberflächenproben und aus dem Leberkomplex erkennbar sind. Es ist durchaus möglich, daß Schlachttierkörper während des Schlachtvorganges (STOLLE und REUTER, 1980 b; PIETZSCH und KAWERAU, 1984) oder BU-Proben bei der Entnahme (FORSCHNER, 1963) oberflächlich mit Salmonellen kontaminiert werden. Da jedoch alle Proben voruntersucht und mehrere Tage gekühlt gelagert waren, ist anzunehmen, daß auch das Austreten von Gewebs- und Gallenflüssigkeit auf die Probenschale zu einer oberflächlichen Kontamination anderer Organe führte. Auch während der Wiederverpackung der Proben vor der Abholung bzw. vor dem Versand könnte durch Pinzetten etc. eine Kontamination stattgefunden haben. Da sich Leberlymphknoten und eröffnete Gallenblasen nur begrenzt an der Oberfläche entkeimen lassen, könnte es sich auch bei den hier nachgewiesenen Salmonellen zumindest teilweise um Oberflächenkontaminanten gehandelt haben. Die Untersuchungen zeigten aber auch, daß oberflächliche

Kontaminationen mit Salmonellen bei mehrtägiger kühler Lagerung von Fleisch und Organen nicht unbedingt zu einer Penetration in die Tiefe der Proben führen müssen, was z. B. die Untersuchungen von FORSCHNER (1963), von ELMOSSALAMI und WASSEF (1971) oder von BENTLER (1977) befürchten ließen.

Die Nachweisbarkeit von Salmonellen auf der Probenoberfläche wird auch bei starkem Begleitkeimgehalt bei Verwendung eines geeigneten Anreicherungsmediums, in diesem Fall MK bei 43⁰ C, nicht beeinträchtigt. Die Untersuchung von Oberflächenproben bietet sich daher bei Untersuchungen im Rahmen der Schlachthygiene, z. B. bei Verdacht auf Kontamination durch gleichzeitig geschlachtete bekannte Ausscheidertiere, oder im Rahmen von Stufenkontrollen an.

Während in der Untersuchungsserie 1 die Mituntersuchung des Leberkomplexes für das Gesamtergebnis nicht von Bedeutung war, erfolgten in der Untersuchungsserie 2 40 % der Salmonellennachweise nach dem amtlichen BU-Verfahren nur aus dem Leberkomplex. Auch in der Serie 3 waren die Nachweise aus dem Leberkomplex viel häufiger als die aus dem reduzierten Probenansatz. Die Auswertung der Ergebnisse von Salmonellenuntersuchungen an der BU-Stelle des Schlachthofs Nürnberg über einen Zeitraum von sechs Jahren ergab gleichfalls, daß Salmonellen, insbesondere bei Rindern, hauptsächlich aus der Leberkomplexanreicherung stammten, wobei im Direktausstrich aus der Galle die meisten Nachweise erfolgten.

In keiner der 3 Untersuchungsserien konnten alle Salmonellennachweise mit einer Anreicherungs-methode alleine geführt werden. Ähnliche Ergebnisse sind bei fast allen vergleichenden Untersuchungen auf Salmonellen in der Literatur zu finden. Da verschiedene Faktoren, wie z. B. Bebrütungstemperatur, Art und Menge der Begleitflora und Anreicherungs-empfindlichkeit der jeweiligen Salmonellenspezies, die Nachweisbarkeit von Salmonellen beeinflussen (FAGERBERG und AVENS, 1976; HARVEY und PRICE, 1979; PIETZSCH, 1981), ist dieses auch nicht außergewöhnlich. Daher empfehlen viele Autoren die parallele Verwendung mehrerer Anreicherungs-systeme (FAGERBERG und AVENS, 1976).

Andererseits konnten aber REUSSE et al. (1975) im Rahmen der BU wiederholt feststellen, daß nur in einer von vier parallel mit der gleichen Methode angereicherten Proben Salmonellen nachweisbar waren, was sie auf die unterschiedliche Salmonellenverteilung im Untersuchungsmaterial zurückführten.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sind eigentlich nur die Anreicherungs-systeme SC bei 37° C und MK bei 43° C direkt vergleichbar, da hier von gleichem Probenmaterial, gleicher Aufbereitungsmethodik und gleichen Plattierungsmedien ausgegangen wurde. Die Überlegenheit von SC bei 37° C gegenüber MK bei 43° C in der Untersuchungsserie 1 steht im Widerspruch zur Überlegenheit von MK bei 43° C gegenüber SC bei 37° C in den Untersuchungsserien 2 und 3. Dies hängt wohl mit dem höheren allgemeinen Keimgehalt des in Serie 2 und 3 verwendeten Untersuchungsmaterials zusammen, da dieses voruntersucht und einige Tage lang gelagert war. Der Einfluß des Keimgehaltes wird auch beim Vergleich der Salmonellenausbeute bei Oberflächen- und Tiefenproben deutlich, wobei bei Oberflächenproben, die ja einen wesentlich höheren Keimgehalt haben dürften als Tiefenproben, MK bei 43° C deutlich überlegen war.

Bekanntlich ist die Bebrütung bei 43° C dann von Vorteil, wenn die zu untersuchenden Proben einen starken Begleitkeimgehalt aufweisen, weil die Begleitflora unterdrückt wird (FAGERBERG und AVENS, 1976; PIETZSCH, 1981). Dagegen ist die Bebrütung bei 37° C vorteilhafter, wenn die Proben einen geringeren Begleitkeimgehalt aufweisen (PIETZSCH, 1981).

Nach VAN SCHOTHORST et al. (1977) nimmt in MK bei 43° C die Salmonellenzahl bei Untersuchung von Reinkulturen ab, bei Anwesenheit einer Begleitflora dagegen zu. Von 24 Salmonellenstämmen in Reinkultur waren nach Bebrütung in MK bei 43° C nur 3 nachzuweisen, in SC bei 37° C und Selenit-Brillantgrün-Anreicherung bei 37° C alle 24, dagegen waren in den selenithaltigen Medien bei 43° C nur 19 Stämme nachzuweisen. Auch VASSILIADIS et al. (1974) stellten fest, daß sich viele Salmonellenstämmen in Reinkultur in MK bei 37° C und noch ausgeprägter in MK bei 43° C schlecht oder gar nicht vermehrten, insbesondere bei wenig Inokulat, was durch Zugabe von 5 % salmonellenfreien menschlichen Stuhlproben deutlich verbessert werden konnte.

KAFEL und BRYAN (1977) fanden, daß bei MK bei 43° C die besten Isolierungsergebnisse bei der Untersuchung von Hackfleischfiltrat mit hohem Keimgehalt lieferte.

EDEL und KAMPELMACHER (1969) zeigten in einer internationalen Vergleichsuntersuchung, daß MK bei 43° C nach Voranreicherung die besten Ergebnisse auch im Vergleich mit laboreigenen Methoden lieferte, wobei selenithaltige Medien auch am schlechtesten abschnitten. ERDMAN (1974) bewies ebenfalls in einer internationalen Vergleichsuntersuchung mit Hackfleisch die Überlegenheit von Tetrathionat-Anreicherung bei 43° C gegenüber 35° C. Bei 35° C war aber die Ausbeute von SC besser, sie wurde durch Bebrütung bei 43° C gesteigert, erreichte aber die Nachweisraten von Tetrathionat-Anreicherung bei dieser Temperatur bei weitem nicht. Dagegen war die Ausbeute mit Selenit-Brillantgrün-Sulfadiazin-Anreicherung sowohl bei 35° C als auch bei 43° C der Tetrathionatanreicherung bei 43° C ebenbürtig. Auch BAILEY et al. (1981) erzielten bei der Untersuchung von Hackfleisch bei einer Bebrütungstemperatur von 37° C mit SC bessere Ergebnisse als mit Tetrathionatanreicherung. Die Beimpfung von beiden Anreicherungen mit Salmonellenreinkulturen ermöglichte in SC schon bei sehr geringen Inokulummengen den Salmonellennachweis, während in Tetrathionatanreicherung größere Mengen nötig waren.

Die Stückprobenanreicherung in PR bei 37° C kann wegen des unterschiedlichen Untersuchungsmaterials (Mit'anreicherung von Leberlymphknoten und Galle) nur indirekt mit den Homogenisatanreicherungen des reduzierten Probensatzes in SC und MK verglichen werden. Die Homogenisierung der Proben dürfte allerdings, wie bereits besprochen, auf die Vergleichbarkeit der Untersuchungen keinen Einfluß haben.

In der Serie 1, in der schwächer keimhaltige Proben untersucht wurden und in der die Leberkomplexanreicherungen für den Salmonellennachweis nicht von Bedeutung waren, konnte mit SC ein Nachweis mehr geführt werden als mit PR. Beide Anreicherungen waren aber gegenüber MK bei 43° C überlegen. In der Serie 2 dagegen, in der die Proben stark keimhaltig waren, war das Gesamtergebnis mit MK bei 43° C und PR gleichwertig. Da jedoch von den 5 nur mit PR möglichen Nachweisen 4 nur aus der Leberkomplexanreicherung erfolgten, in einem Fall zusätzlich auch noch aus

dem Direktausstrich der Galle, muß gefolgert werden, daß MK bei 43° C insgesamt die erfolgreichere Methode war, da sie auch ohne Mituntersuchung von Leberlymphknoten und insbesondere Galle, die zu den wichtigsten Salmonellenfundorten zählen (siehe Auswertung der Salmonellenfunde im Rahmen der routinemäßig durchgeführten BU), gleich gute Ergebnisse erbrachte. Der Grund für diese Unterlegenheit von PR dürfte wohl gewesen sein, daß PR den starken Begleitkeimgehalt nicht genügend unterdrückte, was zu einem sehr starken Keimwachstum, teilweise sogar zur Keimüberwucherung auf der nur schwach hemmenden ENDO-Platte führte und dadurch die Identifizierung von Salmonellen erschwerte.

Aufgrund eines Rundschreibens des Bundesgesundheitsamtes (Rundschreiben Nr. 16 vom 3.5.1968) wurden unter anderem im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung in verschiedenen Veterinäruntersuchungsanstalten Vergleichsuntersuchungen über die Salmonellenausbeute mit PR bei 37° C und MK bei 43° C durchgeführt (PIETZSCH, 1982). Dabei zeigte sich in manchen Instituten eine leichte Überlegenheit von MK bei 43° C bei teilweise geringer Anzahl von positiven Nachweisen insgesamt. Andere Untersuchungsanstalten dagegen erzielten mit PR bei 37° C bessere Ergebnisse. Von vielen, wenn auch nicht allen Untersuchenden wurde berichtet, daß MK bei 43° C die Begleitflora besser hemmte. Diese Ergebnisse sprechen insgesamt auch dafür, daß bei frisch eingesandten BU-Proben mit relativ geringem Keimgehalt von der Verwendung von MK bei 43° C kein Vorteil, unter Umständen sogar ein Nachteil zu erwarten ist.

Beim Vergleich der Ergiebigkeit der Plattierungsmedien zeigt sich, daß mit keinem der Medien alle Salmonellennachweise alleine geführt werden konnten. Aufgrund verschiedener Literaturberichte ist dieses nicht überraschend, denn offensichtlich ist es mit keinem Medium möglich, alle positiven Proben zu erfassen. Aus diesem Grunde wird auch die Verwendung mehrerer verschiedener Plattierungsmedien empfohlen (FAGERBERG und AVENS, 1976).

Während sich bei den eigenen Versuchsdaten beim Vergleich der Ergiebigkeit zwischen XLD und BPLS kaum Unterschiede ergaben, zeigte ENDO gegenüber BPL als Plattierungsmedium in Verbindung mit PR bei 37° C etwas mehr Nachweise. Andererseits hemmte ENDO die insbesondere in

der Untersuchungsserie 2 sehr stark ausgeprägte Begleitflora so wenig, daß es zu einem sehr starken Wachstum von Fremdkleimen kam, was die Identifizierung von Salmonellen erschwerte und zu einem erheblichen Aufwand an Probeagglutinationen führte, der sehr viel höher war als der bei BPL, BPLS und XLD. Sicher trug dazu auch bei, daß PR bei 37° C die Begleitflora bei den stark keimhaltigen Proben zu wenig unterdrückte und daß ein Ausstrich mit einem Glasspatel auch bei Verwendung mehrerer Platten keinen so guten Verdünnungseffekt ergibt wie ein Ösenausstrich. Andererseits zeigte sich beim Vergleich mit BPL, daß ein stärker hemmender und einfacher abzulesender Nährboden auch zu einer schlechteren Ausbeute führen kann. Deshalb wird auch die Verwendung von verschiedenen stark hemmenden Selektivplatten empfohlen (FAGERBERG und ASENS, 1976).

Die Homogenisierung von BU-Proben bringt also offensichtlich kaum eine Verbesserung der Salmonellenausbeute im Rahmen der BU. Die Kombination mehrerer verschiedener Anreicherungs- und Plattierungsmedien verbessert dagegen die Salmonellenausbeute. Für die Untersuchung schwächer keimhaltiger Probensätze hat sich SC bei 37° C, für die Untersuchung stärker keimhaltiger Probensätze dagegen MK bei 43° C als Anreicherungsmedium bewährt.

4. Vergleichende Untersuchungen auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen"

Als Beimpfungstemperatur der LB wurde bei der Untersuchung von Stückproben 80° C gewählt, da frühere Untersuchungen von FRIESS und BUROW (1980) gezeigt hatten, daß bei dieser Temperatur die Ausbeute an "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" größer war als bei Verwendung kochend heißer LB. Bei der Wahl der Beimpfungstemperatur von 60° C für Homogenisate spielte folgende Überlegung eine Rolle: REUSSE (1982) berichtete, daß bei der Entnahme von 80° C heißer LB aus dem Wasserbad während des Beschriftens und des Verbringens in ein Gestell ein Temperaturabfall auf 63° C bis zum Beimpfen stattfand. HOBRECHT (1981) der wegen der ungleichmäßigen Verteilung von Clostridien in der Muskulatur generell die Homogenisierung der Proben für nötig hält, empfahl das Warmhalten der beimpften Röhrchen bei 60° C für 10 Minuten zur Abtötung der unerwünschten, ebenfalls gasbildenden Begleitflora. Bei

dieser Temperatur sollen auch hitzelabile Cl. perfringens-Keime nicht geschädigt werden. Dieses Verfahren wird von ihm routinemäßig bei der Untersuchung von klinischen Proben auf Gasödemerreger angewendet (HOBRECHT, 1975).

Da die Temperatur der LB bei der Beimpfung sich auf Stückproben anders auswirkt als auf homogenisierte Proben, wurden die geprüften Modifikationen, 80° C heiße LB / Stückproben und 60° C heiße LB bei 10 Minuten Heißhaltezeit / Homogenisat, als vergleichbar angesehen.

Die Version von 60° C hatte offensichtlich auf die Abtötung der die Trübung und Gasbildung hervorrufenden Begleitflora nicht den gewünschten Effekt im Vergleich zur Stückprobenbeimpfung bei 80° C, wie aus der hohen Anzahl von falsch-positiv reagierenden LB-Röhrchen bei 60° C zu ersehen ist. Die Auswertung der falsch-positiven Reaktionen in der LB zeigt außerdem, daß der mikroskopische Nachweis von grampositiven Stäbchen in der LB laut AB.A keinesfalls den Schluß zuläßt, daß es sich dabei um "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" oder gar Clostridien handelt. Vielmehr kann erst nach Auswertung einer aeroben und einer anaeroben Subkultur eine Aussage darüber gemacht werden, ob die grampositiven Stäbchen wirklich obligat oder nur fakultativ anaerob wachsen.

Innerhalb des im Rahmen der BU vorgegebenen Zeitraums von 48 Stunden kann mit Hilfe der im Rahmen der BU gebräuchlichen Medien LB und DB nur festgestellt werden, ob "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" in der Probe vorhanden waren. Bestenfalls kann eine orientierende Identifizierung von Cl. perfringens anhand der folgenden Merkmale erfolgen (EISGRUBER und REUTER, 1984): Nachweis von überwiegend kurzen, plumpen, deutlich grampositiv angefärbten Stäbchen ohne Tendenz zur Sporenbildung; zweistufige Hämolyse; Grünfärbung der Kolonien nach Luftzutritt; positive saure Phosphatase-Reaktion nach UENO.

Für die unterschiedliche Ergiebigkeit der beiden Aufbereitungsmethoden beim Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" kommen mehrere Faktoren in Betracht. REUSSE (1982) und GEMMER (1982) stellten bei ihren Untersuchungen im Rahmen der BU fest, daß sich positive Nachweise häufig bei Nachuntersuchungen nicht reproduzieren lassen. Sie führten dieses unter anderem auch darauf zurück, daß Ober-

flächenkeime bei der Erstanzüchtung für den Nachweis verantwortlich waren. Auch Paralleluntersuchungen bei verschiedenen Beimpfungstemperaturen (REUSSE, 1982) ergaben oft verschiedene Ergebnisse, die von ihrer Zusammensetzung her offensichtlich nicht nur auf die Beimpfungstemperatur zurückzuführen waren. Ein Grund dafür mag sein, daß Clostridien in der Muskulatur von Schlachttieren nur in geringer Menge und ungleich verteilt vorkommen (LEVETZOW, 1982). Dafür sprechen auch die Ergebnisse von EISGRUBER und REUTER (1984), die bei jeweils dreifachem Ansatz von LB mit 6 verschiedenen Aufbereitungs- und Temperaturmodifikationen Muskelproben von 141 Schweinen untersuchten. Sie wiesen in 15 Probensätzen Clostridien nach, wovon 9 Isolate nur aus einem von jeweils 18 angesetzten Röhrchen stammten und 3 Isolate aus je 2 Röhrchen mit unterschiedlichem Behandlungsverfahren. Sie schlossen daraus, daß weniger die Art der Probenaufbereitung als vielmehr der Mehrfachansatz einer Probe dem "Lotteriespieleffekt" bei der Kultivierung von geringen Clostridienzahlen aus frischem Fleisch entgegenwirkt.

Nach NARAYAN (1966 a) und LEVETZOW (1969) sind in der Muskulatur von Schlachttieren Clostridien nur in geringer Anzahl zu finden, meist weniger als 10 Keime/g. Bei ungleicher Verteilung der Keime würde dieses bedeuten, daß möglicherweise gar nicht in jedem entnommenen Probenstück Erreger in nachweisbarer Menge vorhanden waren. In Bezug auf die hier untersuchten Homogenisate (0,5 ml Homogenisat enthielten 0,1 g Probenmaterial) kann sogar geschlossen werden, daß sogar bei angenommener gleichmäßiger Verteilung nur bei einem Clostridiengehalt von mindestens 10 Keimen/g Muskulatur in jedem beliebig entnommenen Inokulat ein Keim vorhanden gewesen sein kann. Daher ist nicht auszuschließen, daß die mehrfach geringere Keimmenge im Homogenisat im Vergleich zur Stückprobe trotz besserer Probenaufbereitung zu einer geringeren Nachweisrate führte. Allerdings fanden EISGRUBER und REUTER (1984) im Rahmen der bereits vorher angeführten Untersuchungen trotz der Unterschiede der Probenmenge mit Stückproben und Homogenisaten annähernd gleich häufig Clostridien.

Die Untersuchungen von BEERENS et al. (1974) zeigten, daß die Homogenisierung von Proben unter sauerstofffreier Atmosphäre die Nachweisbarkeit von Clostridien nicht verbesserte, ja sogar verschlechterte. Die Homogenisierung von Lebensmittelproben zum quantitativen Nachweis von Cl. perfringens unter aeroben Bedingungen in Stomachern oder Blendern

ist überdies ein übliches Verfahren (SHARPE und HARSHMAN, 1976; HARMON und KAUTTER, 1979). Dagegen ist jedoch geltend gemacht, daß beim Arbeiten mit Clostridien wegen ihrer Sauerstoffempfindlichkeit möglichst anaerobe Arbeitsbedingungen herrschen sollten (ANDERSON und FUNG, 1982). Sie zitierten das Phoenix-Phänomen bei Cl. perfringens, das auf Sauerstoffschädigung und damit verbundenem Absterben von großen Teilen einer Population und späterem verstärktem Wachstum der Kultur beruht und das sich durch anaerobe Arbeitstechnik verhindern läßt. Es ist anzunehmen, daß bei der Beschickung der LB mit grob zerkleinerter Muskulatur die darin enthaltenen "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" weniger mit Sauerstoff in Berührung kamen als bei der Homogenisierung.

Verschiedene Untersuchungen haben eindeutig bestätigt, daß die Verlängerung der Bebrütungszeit der Leberbrühe auf 48 oder gar 72 Stunden die Nachweisbarkeit von Cl. perfringens und anderen "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" verbessert (KRAUS, 1962; GEMMER, 1981; EISGRUBER, 1982; REUSSE, 1982). Demgegenüber muß die BU innerhalb von 48 Stunden abgeschlossen sein, was eine 48-stündige Bebrütung der LB mit anschließendem Plattenausstrich nicht zuläßt.

Es wäre mit Hinblick auf das oben zitierte Phoenix-Phänomen durchaus denkbar, daß die Nachteile der Probenhomogenisierung (geringere Probenmenge im Inokulat, möglicher Einfluß des Luftsauerstoffs) bei längerer Bebrütungsdauer der LB durch die Vorteile der Homogenisierung (gleichmäßige Verteilung der Keime im Inokulat, Erfassung aller vorhandenen Keime aus der Muskulatur) wieder aufgewogen würden oder daß die Verimpfung eines Homogenisats sogar eine höhere Ausbeute an "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" bewirken würde.

Die Homogenisierung von Muskelproben zum Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" ist unter den gegebenen zeitlichen Limitierungen der BU nicht zu rechtfertigen. Zur Ausschaltung der störenden Begleitflora sollte 80° C heiße LB verwendet werden. Die aerobe und anaerobe Subkultivierung von LB nach Trübung mit/ohne Gasbildung auf einen festen Nährboden, z. B. DB, ermöglicht eine Abgrenzung der fakultativ anaerob wachsenden von den "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" im Gegensatz zum bisher üblichen mikroskopischen Nachweis mit Hilfe eines nach GRAM gefärbten Ösenausstrichs. Zusätzlich

können Kolonien auf der anaerob bebrüteten DB-Platte aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften beurteilt und gegebenenfalls einem Schnelltest zur vorläufigen Identifizierung von *C. perfringens* unterzogen werden.

5. Interpretation der Erhebungen aus dem routinemäßigen Nachweis von Salmonellen an einer Untersuchungsstelle

Salmonellenisolierungen erfolgten insbesondere bei erwachsenen Rindern, aber auch bei Schweinen hauptsächlich aus der Anreicherung des Leberkomplexes. Dagegen erfolgten bei Kälbern die Nachweise aus der Leberkomplexanreicherung nur unwesentlich häufiger als aus der Anreicherung der übrigen Organe. Auch im Direktausstrichverfahren stammten bei erwachsenen Rindern und Schweinen mit Abstand die meisten Nachweise aus Leber, Leberlymphknoten und Galle, bei Schweinen allerdings auch vermehrt aus der Milz. Bei beiden Tierarten war die Nachweisrate aus der Gallenblase mehr als doppelt so hoch wie aus jedem anderen Organ. Dagegen erfolgten bei Kälbern Nachweise aus der Niere fast so häufig wie aus der Gallenblase und aus der Milz so häufig wie aus der Leber.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß sich bei erwachsenen Tieren Salmonelleninfektionen mehr auf das Leber-Galle-System beschränken und daß es sich bei ihnen vermehrt um Ausscheidertiere handelt. Dagegen scheinen bei Jungtieren wie Kälbern auch Allgemeininfectionen, d. h. Ausbreitungen auf andere Organsysteme häufig vorzukommen.

Die Ausführungen von PIETZSCH (1981) bestätigen diese Interpretation. Demnach gelangen Salmonellen, die die Darmschranke durchbrechen, über die Pfortader in die Leber und von dort in die Gallengänge und die Gallenblase, wo sie lange persistieren können. Auf dem Blutwege können sie auch in andere Organe vordringen und zu Allgemeinerkrankungen führen. Hauptsächlich Jungtiere erkranken klinisch, während erwachsene Tiere häufig nur Träger und Ausscheider sind.

Die im Zusammenhang mit Salmonellenfunden im Rahmen der BU von PIETZSCH (1982) ausgewerteten Vorberichte (siehe Tab. 2) zeigen deutlich, daß zwischen 1972 und 1981 bei erwachsenen Rindern Erkrankungen von Leber und Galle mit Abstand im Vordergrund standen, was auch die Auffassung

bestätigt, daß sich hier die Salmonelleninfektionen mehr auf diese Organe beschränken. Bei Kälbern und Schweinen waren Erkrankungen von Leber/Galle und Niere von vergleichbarer Bedeutung. Auch in diesen Organen wurden ja im Direktausstrich vermehrt Salmonellen nachgewiesen. Allerdings standen bei Kälbern und Schweinen Erkrankungen der Lunge im Vordergrund, bei Schweinen erreichten auch Erkrankungen des Herzens und der Muskulatur erhebliche Bedeutung. Solche Erkrankungen sind bei diesen Tierarten generell sehr häufig und müssen nicht mit Salmonelleninfektionen in Verbindung gebracht werden. Sie führen aber sicher zu einer Schwächung des Organismus, welche die Ausbreitung von bereits im Körper vorhandenen Salmonellen begünstigen kann.

Bei Überlegungen, inwieweit sich die Zahl der einzusendenden Proben für die BU im Hinblick auf den Salmonellennachweis reduzieren läßt, muß man unter Berücksichtigung der gefundenen Daten bedenken, daß das Wegfallen der Galle zwangsläufig zu einer Reduzierung der Salmonellenisolate führen muß. Die Gallenblase wird zwar normalerweise bei der Schlachtung entfernt, steht aber mit der Leber über die Gallengänge in direkter Verbindung. Deshalb muß beim Vorhandensein von Salmonellen in der Gallenblase auch mit deren Vorkommen in den Gallengängen im Bereich der Leberpforte gerechnet werden.

Auf Leber, Milz oder Niere zu verzichten, wäre aufgrund der gefundenen Verteilung der Salmonellenfunde undiskutabel. Dagegen scheint die Muskulatur für den Salmonellennachweis nicht von Bedeutung zu sein.

Zur Bedeutung von Körper- und Leberlymphknoten wäre zu sagen, daß nach Untersuchungen von MARX und REUTER (1976) bei Lymphknoten auch durch eine Oberflächenentkeimung mittels Eintauchen in Alkohol mit anschließendem Abflammen nur eine Reduzierung der Oberflächenkeime zu erreichen ist. Der Reduzierungseffekt vermindert sich noch dazu, wenn die Proben unter ungünstigen Temperaturverhältnissen gelagert werden. Dabei stellt sich die Frage, ob Salmonellennachweise in Lymphknoten nicht zum Teil auf oberflächliche Kontamination zurückzuführen sind. Da Salmonellen in Körperlymphknoten ohnehin im Direktausstrich im Vergleich zu den anderen

Organen seltener nachgewiesen wurden und in den Leberlymphknoten nur in vier Fällen nicht in Verbindung mit anderen Organen, kann man auf die Lymphknoten zum Salmonellennachweis wohl verzichten.

Auf den Direktausstrich von Stückproben zum Nachweis von Salmonellen sollte auch weiterhin nicht verzichtet werden. Nach Tab. 17 waren unter den nur im Direktausstrich, also nicht über Anreicherung, nachgewiesenen Salmonellen (4% aller Nachweise) keine als anreicherungsempfindlich bekannten Spezies (PIETZSCH, 1981). Es handelte sich meistens um weit verbreitete Spezies, wie *S. typhi-murium* und *S. enteritidis*. Die Tatsache, daß alle sechs betroffenen Salmonellenspezies in der Mehrzahl der Fälle in der Anreicherung nachgewiesen wurden, spricht dafür, daß nicht die Anreicherungstechnik für diese Ergebnisse verantwortlich war, sondern eher die Zufallsverteilung der Keime in den Proben.

Bei der Betrachtung der isolierten Salmonellenspezies fällt auf, daß *S. typhi-murium* im hier besprochenen Einzugsgebiet ebenso wie im Bundesdurchschnitt eine der am häufigsten isolierten Spezies war (PIETZSCH, 1982). Dagegen wurde *S. dublin* in diesem Gebiet im Vergleich zum Bundesdurchschnitt kaum nachgewiesen. Diese Tatsache dürfte wohl auf Unterschiede in der geographischen und landwirtschaftlichen Struktur zurückzuführen sein. Nach PIETZSCH (1981) wird *S. dublin* hauptsächlich in den Weidegebieten der z. T. feuchten Niederungen Nord- und Nordwestdeutschlands gefunden. Da in den Hügellandschaften des hiesigen Einzugsgebietes jedoch kaum Weidehaltung betrieben wird, fällt auch die für die Verbreitung von *S. dublin* typische Infektionskette weg.

Beim erwachsenen Rind standen noch *S. infantis*, *S. enteritidis* und *S. london* im Vordergrund, beim Kalb kam *S. enteritidis* sogar häufiger vor als *S. typhi-murium*, auch *S. infantis* wurde sehr häufig nachgewiesen. Beim Schwein zählten noch *S. london*, *S. derby* (var.) und *S. panama* zu den Hauptkeimen. Die hier aufgeführten Salmonellenspezies wurden mit Ausnahme von *S. london* bei den genannten Tierarten zwischen 1961 und 1981 auch im Bundesgebiet neben *S. typhi-murium* und *S. dublin* am häufigsten isoliert (PIETZSCH, 1982), allerdings nicht so zahlreich wie im Einzugsgebiet der BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg.

6. Vorschläge der DVG zur Reform der BU und BU-Vorschriften aus anderen Ländern

REUTER legte 1983 im Namen der Arbeitsgruppe "Mikrobiologische Fleischuntersuchung" des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) einen Vorschlag zur Änderung der BU nach Anlage 1 zu § 20 AB.A vor. Diese Empfehlung wurde von der DVG inzwischen dem zuständigen Ministerium zugestellt.

In diesem Vorschlag wurde die Anzahl der obligat einzusendenden Proben auf 5 reduziert, und zwar Muskulatur aus dem Vorder- oder vorzugsweise dem Hinterviertel einer Tierkörperhälfte, der Bug- oder vorzugsweise der große innere Darmbeinlymphknoten der anderen Tierkörperhälfte, Milz, Niere und ein Stück Leber, das die Leberpforte einschließt. Ein Darmstück sowie die dazugehörigen Lymphknoten sollen nur noch bei Tieren, die aus Salmonellen-Ausscheider-Beständen stammen, aber selbst nicht als Ausscheider ermittelt wurden, eingesandt werden, bei ermittelten Ausscheidern soll sich die BU erübrigen.

Die Reduzierung auf eine Muskelprobe ist aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen zu befürworten, da bei beiden Muskelproben im Direktausstrich ähnliche Keimzahlen gefunden wurden. Ein Verzicht auf die Untersuchung der Muskulatur, wie in der DDR, in den Niederlanden und in Israel üblich (STOLLE und REUTER, 1980 a), wäre nicht zu vertreten, da, wie auch die Untersuchungen zeigten, zwischen dem Keimgehalt von Muskulatur und Organen große Unterschiede bestehen und bei einem hohen Keimgehalt in den Organen nicht auf einen ebensolchen in der Muskulatur geschlossen werden kann. Außerdem bestehen zwischen Muskulatur und Organen große Unterschiede in der geweblichen Struktur und dadurch in der Penetrationsfähigkeit für Mikroorganismen und somit in der Haltbarkeit und der technologischen Verwendung. Das andere Extrem, nämlich, wie in Frankreich, nur die Muskulatur zu untersuchen und die Organe nicht, wäre gar nicht vertretbar, da damit weder Salmonellen noch andere pathogene Erreger, außer vielleicht bei einer Sepsis, in ausreichendem Maße erfaßt werden können.

Die Untersuchung von Lymphknoten ist zwar für den Salmonellennachweis nicht essentiell und birgt die Gefahr der Miterfassung des Oberflächenkeimgehaltes in sich (MARX und REUTER, 1976), andererseits sind bestimmte Erregergruppen bei nicht septikämischem Krankheitsbild dort bevorzugt zu ermittelt, z. B. Rotlaufferreger (PETRI und SCHURIAN, 1959) oder Streptokokken (WEISSER und KÜHLER, 1982). Auf die Untersuchung von Körperlymphknoten wird nur in der DDR, in Frankreich und in den Niederlanden verzichtet (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Die Beibehaltung der Untersuchung von Milz, Niere und Leber ist nicht nur wegen der Salmonellendiagnostik essentiell. Daher ist es fast unverständlich, daß in Frankreich Organe gar nicht untersucht werden, in den Niederlanden nur die Milz, in Norwegen nur die Leber oder in Schweden nur die Milz oder die Leber. Auch wird in manchen Ländern auf die Untersuchung der Niere verzichtet, die ja z. B. bei Kälbern für den Salmonellennachweis sehr wichtig zu sein scheint (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Dagegen ist der Verzicht auf die weitere Untersuchung der Leberlymphknoten wegen der schwierigen oberflächlichen Dekontamination und der hier gefundenen geringen Bedeutung als alleiniges Nachweisorgan für Salmonellen zu vertreten, wenngleich ihre Untersuchung in einigen Ländern vorgeschrieben ist (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Der Verzicht auf die Gallenblase als obligat zu untersuchendes Organ würde allerdings die Zahl der Salmonellennachweise stark reduzieren. Auch wenn die Gallenblase bei der Schlachtung normalerweise entfernt wird, so heißt dieses noch lange nicht, daß die darin möglicherweise enthaltenen Salmonellen nicht auch in den Gallengängen der Leber zu finden sind. Man sollte daher zumindest vorschreiben, daß bei dem eingesandten Leberstück das zu untersuchende Probenstück aus dem Bereich der Leberpforte, wo die großen Gallengänge münden, entnommen wird. Den Ausführungen von STOLLE und REUTER (1980 a) war nicht zu entnehmen, inwieweit in einzelnen anderen Ländern die Einsendung der Galle zwingend vorgeschrieben ist.

Die Palette der Nährböden zum Direktausstrich der Proben wurde in dem Vorschlag um DB erweitert, was die Beurteilung der gewachsenen Keime, z. B. anhand der Hämolyse in manchen Fällen sicher erleichtert. In 6 von 9 anderen europäischen Ländern sind Blutagarplatten ja auch für die Untersuchung vorgeschrieben (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Bei den für den Salmonellennachweis vorgeschriebenen festen Nährmedien soll die Verwendung von BPLS als Alternative zu BPL möglich werden, ein Medium, das sich auch in den vorliegenden Untersuchungen gut bewährt hat. Die Wahl der zweiten Buntplatte soll weiterhin freigestellt bleiben. In anderen europäischen Ländern ist die Verwendung von speziellen Nährböden zum Nachweis von Enterobakteriazeen häufig ganz oder teilweise freigestellt; bei den verbindlich vorgeschriebenen Nährböden überwiegen solche, die Brillantgrün enthalten (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Es soll nach dem Vorschlag dem Untersucher auch die Möglichkeit gegeben werden, zusätzlich andere Platten seiner Wahl für spezifische Erreger einzusetzen. Dadurch können wissenschaftliche und persönliche Erfahrungswerte auch in der BU eingesetzt werden.

Der Methodikvorschlag zielt eindeutig auf die Erfassung des originären Tiefenkeimgehalts hin. Präzise Vorschriften über Entnahme, Transport und Aufbereitung der Proben (z. B. Abtragung der Oberfläche nach deren Denaturierung) sollen den Einfluß des Oberflächenkeimgehalts reduzieren bzw. ausschließen. Die Kriterien für die Abgrenzung eines schwachen Keimgehalts (bis 30 Keime pro Plattenhälfte) vom starken Keimgehalt wurden festgelegt und der Begriff einer "Bakterämie" als "dominieren- des Wachstum von gleichartigen Mikroorganismen in der Probenmehrzahl von frischen Proben" definiert. Der Begriff "Fleischvergifter" wurde durch das Wort "Salmonellen" präzisiert, Listerien wurden als Krankheitserreger direkt angesprochen und der Begriff "unspezifischer Keimgehalt" durch "sonstige Keime" ("Begleitkeimgehalt") ersetzt.

Diese Präzisierung der Vorschriften und damit die konkrete Abgrenzung des "originären" Keimgehalts von der Oberflächen- und Penetrationsflora sowie die bessere Definition der Keimgruppen und deren Quantität würden die Aussagefähigkeit und die Objektivierbarkeit der BU deutlich verbessern.

Die Homogenisierung der Proben wäre aufgrund der Untersuchungsergebnisse begrüßenswert gewesen, da sie jedoch für den Salmonellennachweis offensichtlich keine Verbesserung bringt und den Clostridiennachweis sogar verschlechtern kann, erscheint es fragwürdig, ob sich für die Aussage, ob mehr oder weniger als 30 Keime pro Ausstrich vorliegen, der technische Mehraufwand lohnt. Frankreich ist das einzige Land, in dem BU-Proben (nur Muskulatur!) homogenisiert werden. Im krassen Gegensatz zu diesem Aufwand steht aber dabei die Beimpfung von Agar- und Bouillon-Röhrchen mit dem Homogenisat, die keine quantitative Bewertung zuläßt (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Die Verwendung von 100 ml Anreicherungsflüssigkeit, Selenit- oder Tetrathionatanreicherung nach neuestem Erkenntnisstand anstatt der bisher vorgeschriebenen Medien oder sogar nach verkürzter Voranreicherung des RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium für den Salmonellennachweis, wie vorgeschlagen, ermöglichen eine flexible Anpassung der Diagnostik an wissenschaftliche (z. B. DIN oder ISO-Vorschriften) oder fallbedingte Gegebenheiten, z. B. MK bei 43⁰ C bei stark keimhaltigen, unter ungünstigen Bedingungen eingesandten Proben. Von 8 anderen Ländern stellen nur 3 die Wahl zwischen Tetrathionat- und Selenitanreicherung frei, bis auf eines schreiben alle anderen eine Tetrathionatanreicherung vor (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Die Einführung der Möglichkeit, bei Verdacht von Salmonellenkontamination während der Schlachtung nicht entkeimte Oberflächenproben zu untersuchen, wie vorgeschlagen, wäre sicher ein guter Weg, um diese zu erfassen, wie auch die hier beschriebenen Untersuchungen zeigten. Die Beibehaltung des Ausspatelns bei der Salmonellenanreicherung, auch wenn derselbe Spatel für 3 Platten verwendet wird, kann allerdings zu diagnostischen Schwierigkeiten bei schlecht unterdrückter Begleitflora und schwach hemmenden Plattierungsmedien, z. B. ENDO, führen.

Auch die nur serologische Identifizierung von Salmonellen reduziert den Untersuchungsaufwand und ist wegen unserer staatlich geprüften Seren ohne weiteres zu verantworten (PIETZSCH, 1976). In anderen Ländern sind dagegen mehr oder weniger aufwendige biochemische Überprüfungen vorgeschrieben (STOLLE und REUTER, 1980 a).

Der Clostridiennachweis beschränkt sich in 9 anderen europäischen Ländern nur auf die Untersuchung mit Hilfe von LB, Traubenzucker-Hochschicht-Agar, Thioglykolat-Medium, Blutagar oder in den meisten Fällen sulfitreduzierender Medien, wobei eine mikroskopische Untersuchung nur in Schweden und in der Schweiz vorgeschrieben ist (STOLLE und REUTER, 1980 a). Die Diagnose "Clostridien nachgewiesen" nur aufgrund von Gasbildung oder Sulfitreduktion erscheint wegen der vielen falsch-positiven Reaktionen hier bzw. in früheren Untersuchungen (FRIESS und BUROW, 1980 ; HENNER, 1980; REUSSE, 1982) als nicht vertretbar. Die Arbeitsgruppe "Mikrobiologische Fleischuntersuchung" präziserte in ihrem Vorschlag die Untersuchungsmethodik, indem sie bei Verdacht auf das Vorliegen "obligat anaerob wachsender grampositiver Stäbchen" nach mikroskopischer Kontrolle positiv reagierender LB die parallele aerobe und anaerobe Subkultivierung auf DB mit erneuter mikroskopischer Kontrolle befürwortet und gleichzeitig noch Schnellverfahren zur vorläufigen Identifizierung von Cl. perfringens vorschlägt. Die Einführung dieser Methodik würde bei vertretbarem Aufwand die weitestgehende Ausschaltung von falsch-positiv reagierenden Keimen und die eventuelle vorläufige Identifizierung von Cl. perfringens innerhalb der 48-Stunden-Frist und damit eine sicherere Beurteilung des Tierkörpers ermöglichen.

7. Absichten der EG zur Erfassung mikrobiologischer Schwachpunkte in der Fleischhygiene

Der wissenschaftliche Veterinärausschuß der EG hat auf Veranlassung des zuständigen Sekretariats eine Arbeitsgruppe "Mikrobiologie bei der Gewinnung von 'rotem' Fleisch" gebildet und entsprechende Sachverständige berufen. Diese haben sich in drei Sitzungen mit den Fragen befaßt, was mikrobiologische Kontrollen bei der Fleischgewinnung leisten können, welche Mikroorganismen von Bedeutung sind, welche Probenentnahmetechniken und Analysenmethoden geeignet sind, wie die Ergebnisse zu interpretieren sind und wo die kritischen Punkte bei der Gewinnung, Lagerung und Verteilung im Hinblick auf eine Kontrolle liegen.

Im Rahmen der Diskussionen wurden dazu folgende Schlüsse gezogen: Mikrobiologische Untersuchungen können einen Einblick in hygienische

Fehler bei der Fleischgewinnung erbringen. Die Befunde, vor allem über die Gesamtkeimzahl, können vorerst nur für die betriebsinterne Kontrolle verwendet werden und sollen vorerst nur der Beratung dienen. An Untersuchungen wird die Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der Coliformen oder der Enterobakteriazeen, bei einigen Produkten auch die der fäkalen Streptokokken, für nützlich gehalten. Probeentnahmestellen wurden für jede Tierart festgelegt, als Probeentnahmetechnik wurde das Tupfverfahren favorisiert, das auch kostenmäßig tragbar ist. Außerdem wurden allgemein bekannte hygienische Problemstufen bei der Schlachtung tabellarisch zusammengefaßt (RING et al., 1984).

Eine Untersuchung von Oberflächenproben auf Salmonellen, wie im Rahmen dieser Untersuchung, von STOLLE und REUTER (1980 b) oder PIETZSCH und KAWERAU (1984) durchgeführt, könnte zwar auch gute Einblicke in die Schwachstellen der Betriebshygiene geben, wäre aber wahrscheinlich im Rahmen großangelegter Untersuchungen zu aufwendig und zu teuer. Dagegen kann die Einführung von hygienischen Kontrollen, basierend auf Gesamtkeimgehalt und z. B. Enterobakteriazeengehalt, die Betriebshygiene auch wesentlich verbessern und damit, wie in der Literaturübersicht ausführlich dargestellt, den Oberflächenkeimgehalt und speziell die Kontamination mit Salmonellen und Clostridien zum Teil erheblich reduzieren (REUTER, 1984; SNIJDERS et al., 1984).

Mit der Einführung derartiger Untersuchungen würden damit auch die gesunden Tiere im Rahmen der Fleischhygiene erfaßt. Die bisherige BU würde jedoch damit nicht hinfällig werden, denn nach SNIJDERS et al. (1984) gehört zu einer guten Betriebshygiene auch, daß als krank erkannte Tiere getrennt von den anderen geschlachtet werden. Diese Tiere werden wohl auch weiterhin vor ihrer fleischbeschaulichen Beurteilung einer BU im klassischen Sinn unterzogen werden müssen, da der Oberflächenkeimgehalt alleine wohl kaum Aufschluß über das Vorhandensein spezifischer Krankheitserreger im Tierkörper geben kann.

E. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Homogenisieren von BU-Proben im Stomacher stellt ein rationelles, wenig arbeits- und geräteaufwendiges Verfahren dar. Es ermöglicht die Quantifizierung des allgemeinen Tiefenkeimgehaltes, wenn das Untersuchungsmaterial ohne Oberflächenkontamination entnommen wird, was bei entsprechender Sorgfalt und bei geübtem Personal ohne weiteres möglich ist.

Für homogenisierte Muskelproben ergibt sich ein etwas höherer Nachweisanteil stärker keimhaltiger Proben und gleichzeitig eine Ver-
ringerung der Anzahl der keimfreien Proben.

Auch bei homogenisierten Organen muß in der Regel mit einem etwas höheren Keimgehalt gerechnet werden, wenn diese, wie in der kälteren Jahreszeit, allgemein weniger stark keimhaltig sind. Bei stark keimhaltigen Proben kommt es hingegen zu einer Angleichung der Nachweisraten oder gar zu einem Übergewicht zugunsten der Stückproben.

Homogenisierte Muskelproben sind zum Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" weniger geeignet, weil durch den Verdünnungseffekt die Chance, wenige und ungleich verteilte Clostridien zu erfassen, offensichtlich reduziert wird. Außerdem besteht beim Homogenisieren die Gefahr der zumindest vorübergehenden Schädigung besonders sauerstoffempfindlicher Keime.

Homogenisierte Probensätze zum Nachweis von Salmonellen bringen kaum eine Verbesserung der Ausbeute.

Oberflächenproben erhöhen die Zahl der Salmonellenfunde wesentlich. In ihrer Nachweisshäufigkeit kommen sie den Befunden aus der Leberkomplexanreicherung am nächsten. Beim Anlegen von Proben ist auf strikte Trennung von Tiefenproben und Oberflächenproben zu achten. Die Penetrationsfähigkeit von Salmonellen hält sich bei mehrtägiger kühler Lagerung der Proben in Grenzen, wie die unterschiedlichen Nachweisraten in Oberflächen- und Tiefenproben zeigen.

Der Direktausstrich von Proben auf feste Medien erhöht die Zahl der Salmonellennachweise.

Mehrere gleichzeitig verwendete Anreicherungs- und Plattierungsmedien verbessern den Nachweis von Salmonellen. Bei Proben mit geringerem Begleitkeimgehalt ist die Selenit-Cystin-Anreicherung (SC) bei 37° C Bebrütungstemperatur im Vergleich zur Tetrathionatanreicherung nach PREUSS (PR) bei 37° C und nach MULLER-KAUFFMANN (MK) bei 43° C besser geeignet. Bei höherem Keimgehalt und bei Oberflächenproben werden mit MK und bei 43° C die besten Ergebnisse erzielt. PR ist insbesondere in Verbindung mit schwach hemmenden Plattierungsmedien, wie ENDO-Agar, für die Untersuchung von stark keimhaltigen Proben wenig geeignet. Die Plattierungsmedien Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose (BPLS)-Agar und Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar haben sich gut bewährt.

Für den Nachweis von Salmonellen wird die Untersuchung der Gallenblase als wichtig angesehen. Die hohe Zahl von Salmonellenisolierungen, insbesondere bei erwachsenen Rindern, aber auch bei Schweinen, aus dem Leberkomplex im Gegensatz zu den anderen Organen läßt vermuten, daß es sich bei diesen hauptsächlich um Ausscheidertiere handelte. Bei Kälbern scheinen aufgrund der häufigen positiven Nachweise auch aus anderen Organen, insbesondere der Niere, auch Allgemeininfektionen häufig vorgelegen zu haben.

S. dublin, ein in der Bundesrepublik sonst weit verbreiteter Keim, kommt möglicherweise aufgrund der landwirtschaftlichen Struktur und der Haltungsformen im Einzugsgebiet der Untersuchungsstelle kaum vor.

Für den Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" hat sich eine Beimpfungstemperatur von 80° C für die Leberbrühe bewährt. Eine Herabsetzung auf 60° C mit 10 Minuten Heißhaltezeit ist mit dem vermehrten Auftreten von falsch-positiven Reaktionen verbunden. Das parallele Anlegen einer aeroben und anaeroben Subkultur aus der LB auf Dextrose-Blutagar ermöglicht die Abgrenzung von fakultativ anaerob wachsenden Keimen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU) als Ergänigungsuntersuchung bei der Amtlichen Fleischuntersuchung hat sich in den letzten Jahrzehnten gewandelt. Klinisch manifeste Infektionen sind seltener geworden. Latent infizierte oder durch den Transportstreß mikrobiell beeinflusste Tierkörper sind vornehmlich zu erfassen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob sich durch Homogenisierung der Proben in einem COWORTH-Stomacher die Nachweise des allgemeinen Keimgehalts sowie von Salmonellen und Clostridien verbessern lassen. Außerdem sollten Salmonellennachweise von Oberflächen- und Tiefenproben verglichen und die gebräuchlichen Salmonellenanreicherungs- und -plattierungsmedien geprüft werden. Für den Nachweis von Clostridien in der Leberbrüheanreicherung (LB) sollten andere Beimpfungstemperaturen getestet werden. Eine Auswertung der routinemäßig ermittelten Daten einer großen Untersuchungsstelle in Nordbayern von 1977 - 1982 sollte Aufschluß über die Verteilung der Salmonellenfunde auf Organe bzw. Organsysteme geben, sowie darüber, welche Salmonellenspezies im Einzugsgebiet gehäuft vorkommen.

Die eigenen Untersuchungen bestanden aus 4 Serien in Abhängigkeit von dem zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial und den technischen Möglichkeiten. In einer ersten Serie wurden parallel zur amtlich durchgeführten BU von 219 frisch eingesandten Probensätzen zur Feststellung des Keimgehalts und zum Nachweis von Salmonellen ein Muskelstück sowie eine Organmischung (Milz, Niere und Leber) nach dem Homogenisierungsverfahren getrennt aufbereitet, auf Nähragar (NA), Dextrose-Blut-Agar (DB), Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) ausgespatelt und anschließend zusammen in Selenit-Cystin-Anreicherung (SC) bei 37°C und in Tetrathionatanreicherung nach MÜLLER-KAUFFMANN (MK) bei 43°C angereichert. Der Ösenausstrich erfolgte auf BPLS und XLD. In der zweiten Serie wurden 40 voruntersuchte, stark keimhaltige und zum Großteil salmonellenhaltige BU-Probensätze wie in der ersten Serie auf Salmonellen nachuntersucht. In einer dritten Serie wurden weitere 24 voruntersuchte stark keimhaltige und salmonellenhaltige BU-Probensätze nachuntersucht. Muskulatur, Milz, Niere und Leber wurden zusammen in SC bei 37°C und in

MK bei 43⁰ C, und zwar jeweils homogenisiert und als grob zerkleinerte Stückproben, sowie als Oberflächen- und kontaminationsfrei entnommene Tiefenproben angereichert. Parallel dazu wurden kontaminationsfrei entnommene Tiefenproben von Leber, Leberlymphknoten und Gallenblase als Stückproben angereichert. Zur Untersuchung auf "obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" wurden in einer vierten Serie jeweils zwei Muskelproben von 227 frisch eingesandten 8U-Probensätzen sowohl als Stückproben in 80⁰ C heißer LB, als auch als Homogenisate in 60⁰ C heißer LB mit 10 Minuten Heißhaltezeit angesetzt. Im Falle von Trübung mit/ohne Gasbildung nach 22 - 24 Stunden Bebrütung bei 37⁰ C wurden parallel aerobe und anaerobe Subkulturen auf DB angelegt, mikroskopisch untersucht, und verdächtige Kolonien soweit möglich identifiziert.

Muskulaturproben der Serie 1 waren keimfrei bei 79 % der Stückproben und 60 % der Homogenisate mit 56,6 % Übereinstimmung beider Methoden. Bei den Homogenisaten waren häufiger höhere Keimgehalte zu finden.

Organproben der Serie 1 waren keimfrei bei 14,2 % der Stückproben und 12,3 % der Homogenisate mit 7,3 % Übereinstimmung. Die Organe wiesen insgesamt einen höheren Keimgehalt als die Muskulatur auf. In homogenisierten Organen wurden etwas höhere Werte ermittelt als in Stückproben, wenn der Keimgehalt insgesamt niedrig lag. Im Sommer dagegen, wenn die Proben allgemein einen stärkeren Keimgehalt aufwiesen, kam es zu einer Angleichung der gefundenen Werte oder gar zu einem Übergewicht zugunsten der Stückproben.

Die Nachweisbarkeit von Salmonellen wurde in den 3 Untersuchungsserien durch die Homogenisierung kaum verbessert. In der dritten Serie gelangen 12 Nachweise aus Tiefenproben und je 20 aus Oberflächenproben und aus dem Leberkomplex.

Von den geprüften 3 Anreicherungsmedien für Salmonellen konnten mit keinem alleine alle Nachweise geführt werden. Bei geringerem Begleitkeimgehalt erwies sich SC bei 37⁰ C gegenüber den anderen beiden als Überlegen. MK bei 43⁰ C lieferte Überlegene Resultate bei stark keimhaltigen Proben, d.h. auch bei Oberflächenproben. Die Anreicherung nach PREUSS (PR) bei 37⁰C erwies sich als am wenigsten gut, insbesondere in Kombination mit schwach

selektiven Plattierungsmedien.

Salmonellennachweise wurden auch durch verschiedene Plattierungsmedien beeinflusst. Auf ENDO-Agar gelangen 23 von 25 Nachweisen, auf Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar dagegen nur 18; allerdings war die Auswertung auf ENDO-Agar wegen der schwachen Hemmwirkung auf andere Keime aufwendiger. Auf BPLS gelangen 138 von 145 Nachweisen, auf XLD nur 133.

"Obligat anaerob wachsende grampositive Stäbchen" wurden mit Stückproben in LB (80° C) häufiger isoliert als mit Homogenisat in LB (60° C/10 min. Heißhaltung). Die Zahl der falsch-positiven Reaktionen der LB lag bei 80° C bei 10,3 %, bei 60° C dagegen bei 23 %.

Die Auswertung der Ergebnisse der Routineuntersuchungen ergab, daß die Salmonellennachweise überwiegend aus der Leberkomplexanreicherung erfolgten, am häufigsten insbesondere bei erwachsenen Rindern und bei Schweinen. 96 % der Nachweise waren über Anreicherung möglich, 4 % nur im Direktausstrich. Mit dem Direktausstrich wurden die meisten Nachweise aus der Galle erzielt, gefolgt von Leberlymphknoten und Leber, Milz und Niere, wobei die Niere beim Kalb gleich nach der Galle kam. Nachweise aus den Leberlymphknoten allein erfolgten nur selten. Die Körperlymphknoten waren seltener salmonellenhaltig, die Muskulatur war für den Nachweis von Salmonellen nahezu bedeutungslos.

Beim Rind war die häufigste Salmonellenspezies *S. typhi-murium*, gefolgt von *S. infantis*, *S. enteritidis* und *S. london*, beim Kalb *S. enteritidis*, gefolgt von *S. typhi-murium* und *S. infantis*, und beim Schwein *S. typhi-murium*, gefolgt von *S. london*, *S. derby* und *S. panama*. *S. dublin*, eine in der Bundesrepublik Deutschland sonst weitverbreitete Spezies, trat im Einzugsgebiet kaum auf.

Es ergeben sich für die Aktualisierung der BU folgende Erkenntnisse:

Die Homogenisierung ermöglicht bei kontaminationsfreier Probenentnahme eine zuverlässige Aussage über den allgemeinen Keimgehalt, insbesondere bei Muskelproben. Für den Salmonellennachweis bringt sie kaum eine Verbesserung, während sie für den Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" eher nachteilig zu sein scheint.

Für den Nachweis von Salmonellen wird die Untersuchung von Gallenblase, Leber, Milz und Niere als am wichtigsten angesehen. Sollte man auf die Untersuchung der Gallenblase verzichten, so wird ein Teil der Ausscheidung nicht erfaßt werden. Als Ersatz wäre eine Probe aus der Leberpforte denkbar. Diese Möglichkeit wurde allerdings bei der vorliegenden Arbeit nicht experimentell untersucht.

Der Einsatz von mehreren Anreicherungssystemen und Plattierungsmedien verbessert den Salmonellennachweis. Beim Ansatz von Proben zum Salmonellennachweis sollte auf den Frischzustand derselben und auf die strikte Trennung von Tiefenproben und Oberflächenproben geachtet werden. Bei schwächer keimhaltigen Proben bewährt sich SC bei 37° C, bei stärkerem Keimgehalt ist MK bei 43° C vorzuziehen. PR bei 37° C ist, insbesondere bei stark keimhaltigen Proben, unterlegen. Die bisherige Leberkomplexuntersuchung bringt ähnliche Ergebnisse wie nicht dekontaminierte Oberflächenproben von Muskulatur, Milz, Niere und Leber hervor. Auf den Direktausstrich zum Nachweis von Salmonellen sollte nicht verzichtet werden.

Für den Nachweis von "obligat anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen" ist die Stückprobenbeimpfung der LB bei 80° C zu bevorzugen. Das parallele Anlegen einer aeroben und einer anaeroben Subkultur auf DB aus einer positiv reagierenden LB nach 18 Stunden ermöglicht die Abgrenzung von anderen, fakultativ anaerob wachsenden Keimen.

S U M M A R Y

The importance of bacteriological meat examination as a supplementary examination in official meat inspection has changed during the last decades. Clinically manifested infections have become rare. Latent infections and carcasses, whose microbiological status was influenced by transport stress, mainly have to be traced nowadays.

An aim of this study was to find out, whether the determination of the plate count and of the presence of salmonellae and clostridia can be improved by homogenising samples in a COLLWORTH-stomacher. In addition, the rate of salmonella contamination on the surface of and within the samples was to be compared, and common salmonella enrichment and plating media were to be tested. For the detection of clostridia different inoculation temperatures of the liver broth enrichment (LB) were to be tested.

Routine data from a large bacteriological meat examination laboratory from 1977 to 1982 were evaluated as to the distribution of salmonella findings within the various organs or organ systems examined and the salmonella species mainly encountered in the local area.

The experimental investigations were carried out in four trials depending on samples and technical facilities available. The first trial was carried out in addition to the routine examination of 219 fresh sample sets according to the official method, in order to determine the plate counts and the presence of salmonellae. One piece of musculature and a mixture of spleen, kidney and liver were homogenised separately and plated on nutrient agar (NA), dextrose blood agar (DB), brilliant green phenol red lactose sucrose agar (BPLS), and xylose lysine desoxycholate agar (XLD). Thereafter the two homogenates were mixed and enriched in selenite cystin broth (SC) at 37°C and in tetrathionate broth according to MULLER and KAUFFMANN (MK) at 43°C for 18 - 22 hours. After incubation these enrichments were plated on BPLS and XLD by means of a loop streak. During a second trial 40 preexamined sample sets of high bacterial content and mostly containing salmonellae were reexamined according to the two methods used during the first trial. Another 24 preexamined sample sets of high bacterial counts, containing salmonellae, were used during a third trial.

Pieces of tissue were removed from the surface of musculature, spleen, kidney and liver samples and inoculated together into two SC and two MK enrichments, one of which was homogenised before incubation at 37°C and 43°C, respectively. Aseptically collected tissue from the centre of the same organs, as well as of liver, portal lymph node and gall bladder samples (liver complex) were examined in the same way, except for the fact that those from the liver complex were not homogenised. Incubation time and plating was as in the other trials. Two samples of musculature from each of 227 fresh sample sets were examined for "obligately anaerobic grampositive rods" in a fourth trial. Homogenised musculature tissue was inoculated into LB according to KELCH at a temperature of 60°C, which was maintained for 10 minutes before incubation of the tube at 37°C. Non homogenised samples were inoculated into LB at 80°C, which was incubated at 37°C immediately thereafter. In case of turbidity with or without gas formation in the LB-tubes after 22 - 24 hours, these were subcultured aerobically and anaerobically on DB. Colonies were examined microscopically and suspicious ones were identified if possible.

60% of the homogenised samples of musculature and 79% of the non homogenised ones were sterile. The rate of coincidence was 56.6%. Higher plate counts were encountered among the homogenates more often.

12.3% of the homogenised organ samples and 14.2% of the non homogenised ones were sterile. The rate of coincidence was 7.3%. Generally higher plate counts were encountered in organs as compared to musculature. Homogenised samples yielded higher counts than non homogenised ones, as long as the plate count level was generally low. In summer, however, when the bacterial content of the samples was higher, similar results were obtained with both methods, or even higher counts with non homogenised samples in some cases.

In all three trials, detection of salmonellae was hardly improved by homogenising the samples. During the third trial, salmonellae were isolated from the depth of the tissues in 12 sample sets, and from the surface and the liver complex, respectively, in 20 sample sets.

Only by the concurrent use of all enrichment media salmonellae could be detected in all cases. SC at 37°C proved to be superior with samples of low bacterial content, whereas MK at 43°C was superior with samples

of higher bacterial content including tissue from the surface of the samples. Tetrathionate enrichment according to PREUSS (PR) at 37°C was less successful, especially in combination with plating media of low selectivity.

Salmonella isolation was also influenced by plating media. ENDO agar was successful in 23 out of 25 cases as compared to brilliant green phenol red lactose agar in only 18 cases; however, evaluation of colonies grown on ENDO agar was more elaborate, because competing organisms were not sufficiently suppressed. BPLS was successful in 138 and XLD in 133 out of 145 cases.

"Obligately anaerobic grampositive rods" were detected more often in LB inoculated with non homogenised samples at 80°C than in LB inoculated with homogenised samples at 60°C and kept at this temperature for 10 minutes thereafter. False-positive reactions of LB occurred in 10.3% of the cultures inoculated at 80°C and in 23% of those inoculated at 60°C.

Analysis of the results of routine examinations showed that salmonellae were most often detected in the liver complex, especially in adult cattle and in pigs. 96% of the isolates were found by enrichment, 4% only by direct plating. Most important tissues in the distribution of salmonellae, as found by direct plating, were gall bladder, followed by portal lymph nodes, liver, spleen and kidney. Findings in the kidneys of calves were almost as frequent as in their gall bladders. Portal lymph nodes on their own were almost never sources of salmonellae. The other lymph nodes examined contained salmonellae less often and musculature was almost void.

Salmonella species encountered most often in adult cattle were *S. typhimurium*, followed by *S. infantis*, *S. enteritidis* and *S. london*. In calves *S. enteritidis* predominated, followed by *S. typhimurium* and *S. infantis*, whereas in pigs *S. typhimurium* predominated, followed by *S. london*, *S. derby* and *S. panama*. *S. dublin*, a widespread species in this country, was hardly encountered in the area under investigation.

The following conclusions can be drawn for updating the procedure for the official bacteriological meat examination:

Homogenising samples does facilitate the reliable determination of plate counts, especially for musculature, provided the samples are taken without any superficial contamination. The recovery of salmonellae, however, is hardly improved by homogenisation, which seems to be even disadvantageous for the recovery of "obligately anaerobic grampositive rods".

For the detection of salmonellae the examination of gall bladder, liver, spleen and kidney is considered to be most important. If the gall bladder is not examined, this will result in a reduction of the number of carriers detected. Examining the portal area might substitute for omitting the gall bladder, but no experimental evidence was gained for this during the present investigation.

The concurrent use of several enrichment and plating media will improve the detection of salmonellae. The state of freshness of the samples, as well as the strict separation of the contaminated surface from the depth of the tissues should be considered when examining them. The use of SC at 37°C for examining samples of low bacterial content and of MK at 43°C for samples of high bacterial content will be most suitable. The use of PR at 37°C will yield fewer salmonella isolations, especially with samples of high bacterial content. Similar results can be obtained when examining the liver complex as compared to samples from the non decontaminated surface of musculature, spleen, kidney and liver. Direct plating of samples should not be omitted.

For the detection of "obligately anaerobic grampositive rods" LB should be inoculated at 80°C with non homogenised samples. Concurrent aerobic and anaerobic subcultivation on DB of test tubes showing positive reaction after 18 hours will facilitate the exclusion of optional anaerobes.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

AMTSBERG, G., BISPING, W., EL SUKHON, S. N., MATTHIESEN, I. u. KRABISCH, P.

Untersuchungen zum Vorkommen und zur pathogenen Bedeutung
von Clostridium perfringens Typ A beim Schwein

Berl. Münch. Tierärztl. Wochr. 89, 409 - 414 (1976)

AMTSBERG, G., BISPING, W., KRABISCH, P. u. MATTHIESEN, I.

Zum Vorkommen und zur pathogenen Bedeutung von Clostridium
perfringens beim Kalb

1. Mitteilung: Quantitative bakteriologische Untersuchungen
zum Clostridium perfringens-Keimgehalt im Kot und Darminhalt
von gesunden und erkrankten Kälbern

Zbl. Vet. Med. B 24, 104 - 113 (1977)

ANDERSON, K.L. und FUNG, D. Y.

Anaerobic methods, techniques and principles for food
bacteriology: a review

J. Food Protect. 46, 811 - 822 (1983)

ANGELOTTI, R., HALL, H. E., FOTER, M. J. u. LEWIS, K.M.

Quantitation of Clostridium perfringens in foods

Appl. Microbiol. 10, 193 - 199 (1962)

BAILEY, J. S., COX, N. A. u. THOMSON, J. E.

Efficiency of selenite cystine und TT enrichment broths
for the detection of salmonella

J. appl. Bact. 51, 409 - 414 (1981)

BALTZER, J. u. WILSON, D. C.

The occurrence of clostridia on bacon slaughter lines

J. appl. Bact. 28, 119 - 124 (1965)

BARTELS, H.

Die Untersuchung der Schlachttiere und des Fleisches
P. Parey Verlag, Berlin (1968)

BASENAU, F.

Über eine im Fleisch gefundene infectiöse Bacterie
Arch. Hyg. 20, 242 - 294 (1894)

BAUER, F. T., CARPENTER, J.A. u. REAGAN, J. O.

Prevalence of Clostridium perfringens in pork during
processing
J. Food Protect. 44, 279 - 283 (1981)

BAUMGART, J.

"Der Stomacher" - ein neues Zerkleinerungsgerät zur
Herstellung von Lebensmittelsuspensionen für die
Keimzahlbestimmung
Fleischwirtschaft 53, 1600 (1973)

BEERENS, H. FIEVEZ, L. u. Romond, CH.

Dénombrement des Clostridium a partir de produits
alimentaire pre-reduits - Caracterisation de Clostridium
perfringens
In: (HOBBS, B. C. u. CHRISTIAN, J. H. B., Eds.)
The microbiological safety of food, pp. 307 - 316
Academic Press, New York, London (1974)

BENTLER, W.

Möglichkeiten und Grenzen der bakteriologischen Fleisch-
untersuchung (BU)
Arch. Lebensmittelhyg. 28, 142 - 147 (1977)

ders.

Betrachtungen über Sinn und Aufgaben der bakteriologischen
Fleischuntersuchung (BU) im Rahmen einer fleischhygieni-
schen Gesamtbeurteilung
Schlachten u. Vermarkten 78, 3 - 6 (1978)

ders.

Schnellmethode zur Identifizierung von Clostridium perfringens
Fleischwirtschaft 61, 1686 - 1687 (1981)

BERT, F. u. KLIMA, H.

Feldversuch mit stabilen Kunststoff-Transportgefäßen zur Verwendung in der bakteriologischen Untersuchung und Rückstandsuntersuchung im Rahmen der Schlacht tier- und Fleischbeschau

Fleischwirtschaft 59, 182 - 184 (1979)

BOCKEMÜHL, J. u. SEELIGER, H. P. R.

Die Auswirkungen neuer taxonomischer Erkenntnisse auf die Nomenklatur von bakteriellen Seuchenerregern

Bundesgesundhbl. 28, 65 - 69 (1985)

BÜHM, K. H.

Neue Selektivnährböden für Rotlaufbakterien

Zbl. Bakt. I Orig. A 218, 330 - 334 (1971)

BOGEN, C. u. FORSCHNER, E.

Zum Problem der Probenkühlung während des Transportes

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 90 - 92 (1974)

BREUKINK, H. J., WAGENAAR, G. WENSING, TH., NOTERMANS, S. u. POULOS, P. W.

Food poisoning in cattle caused by ingestion of brewers' grains contaminated with *Clostridium botulinum* type B

Tijdschr. Diergeneesk. 103, 303 - 311 (1978)

BREWER, J. H. u. ALLGEIER, D. L.

Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system

Appl. Microbiol. 14, 985 - 988 (1966)

BURDW, H.

Pers. Mitteilung (1981)

CANADA, J. C. u. STRONG, D. H.

Clostridium perfringens in bovine livers

J. Food Sci. 29, 862 - 864 (1964)

CHILDERS, A. B., KEAHEY, E. E. u. KOTULA, A. W.

Reduction of salmonella and fecal contamination of pork during swine slaughter

J. Am. Vet. Med. Assoc. 171, 1161 - 1164 (1977)

CHILDERS, A. B., KEAHEY, E. E. u. VINCENT, P. G.

Sources of salmonellae contamination of meat following approved livestock slaughtering procedures

J. Milk Food Technol., 12, 635 - 638 (1973)

COHEN, A. u. TAMARIN, R.

Investigations of two mass outbreaks of a botulism-like disease in cattle

IV. Bacteriological investigations

Refu. Vet. 35, 109 - 115 (1978)

COLLEE, J. G., WATT, B., FOWLER, E. B. u. BROWN, R.

An evaluation of the gaspak system in the culture of anaerobic bacteria

J. appl. Bact. 35, 71 - 82 (1972)

COWAN, S. T.

Enterobacteriaceae

In: (BUCHANAN, R. E. u. GIBBONS, N. E., Eds.)

BERGEY'S manual of determinative bacteriology, pp. 290 - 340

The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)

CYGAN, Z., JASTRZEBSKI, T. u. NOWAK, J.

The influence of starvation on the presence of the Clostridium genus bacilli in the organs of healthy cows

Med. Weter. 25, 70 - 72 (1969)

EDEL, W. u. KAMPELMACHER, E. H.

Salmonella isolation in nine European laboratories using a standardized technique

Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 297 - 306 (1969)

EISGRUBER, H.

Pers. Mitteilung (1982)

EISGRUBER, H. u. REUTER, G.

Pers. Mitteilung (1981)

dies.

Vorkommen und Nachweis von Clostridien in frischem Fleisch
Proceed. 25. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Vet.-med. Ges., S. 157 - 166
Garmisch-Partenkirchen, 18. - 21. 9. 1984

ELMOSSALAMI, E. u. WASSEF, N.

Penetration of some microorganisms in meat
Zbl. Vet.Med. B, 18, 329 - 336 (1971)

ELTER, B. u. SCHARNER, E.

Zum Vorkommen von Clostridium perfringens bei gesunden
Schlachtrindern
Ztschft. Ges. Hyg. 14, 766 - 768 (1968)

EMSWILER, B. S., PIERSON, C. J. u. KOTULA, A. W.

Stomaching vs blending. A comparison of two techniques
for the homogenization of meat samples for microbiological analysis
Food Technol. 31, 40 - 42 (1977)

ERDMAN, I. E.

ICMSF methods studies
IV. International collaborative assay for the detection
of salmonella in raw meat
Can. J. Microbiol. 20, 715 - 720 (1974)

FAGERBERG, D. J. u. AVENS, J.S.

Enrichment and plating methodology for salmonella detection
in food. A review
J. Milk Food Technol. 39, 628 - 646 (1976)

FREAME, B. u. FITZPATRICK, B. W. F.

The use of differential reinforced clostridial medium
for the isolation and enumeration of clostridia from food

In: (SHAPTON, D. A. u. BOARD, R. G., Eds.)
Isolation of Anaerobes, pp. 49 - 55

Academic Press, New York, London (1971)

FRIESS, H. u. BUROW, H.

Pers. Mitteilung (1980)

FORSCHNER, E.

Postmortale Infektion und Salmonellenfunde bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 76, 453 - 456 (1963)

ders.

Erfahrungsbericht über den Einsatz von Kühlbehältern zum Proben-transport im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung und der Rückstandsuntersuchung

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 143 - 145 (1975)

GEMMER, H.

Pers. Mitteilung (1981)

ders.

Pers. Mitteilung (1982)

GERATS, G. E. u. SNIJDERS, J. M. A.

Bestimmung von Keimzahlen in der Fleischindustrie.

III. Das Stomacherverfahren und das Spiralplattenverfahren

Arch. Lebensmittelhyg. 29, 57 - 61 (1978)

GILL, C. O. u. HARRIS, L. M.

Contamination of red-meat carcasses by *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*

Appl. Environ. Microbiol. 43, 977 - 980 (1982)

GROSSKLAUS, D.

Die Grenzen der heutigen Schlachttier- und Fleischuntersuchung für die Erkennung bedeutsamer Zoonosen
Schlacht-Viehhof-Ztg. 68, 461 - 468 (1968)

GULISTANI, A.

A survey of the bacteriological condition of carcass meat
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 172 - 176 (1972)

GUTH, F.

Selennährböden für die elektive Züchtung von Typhusbazillen
Zbl. Bakt. I Orig. 77, 487 - 496 (1916)

HAAGSMA, J. u. TER LAAK, E. A.

Atypical cases of type B botulism in cattle , caused by
supplementary feeding of brewers' grains
Tijdschr. Diergeneesk. 103, 312 - 325 (1978)

HABISREITINGER, K.

Der unspezifische Keimgehalt in der bakteriologischen
Fleischuntersuchung (BU)
Schlacht-Viehhof-Ztg. 73, 457 - 460 (1973)

HADLOK, R., GRUNWALD, E. u. BARTELS, H.

Untersuchungen zur Abtrennung von Clostridium botulinum
von anderen Clostridienarten im Rahmen der bakteriologischen
Fleischuntersuchung
Fleischwirtschaft 48, 39 - 44 (1968)

HAJNA, A. A.

A new enrichment broth medium for gramnegative organisms
of the intestinal group
Month. Bull. Minist. Health Public Health Lab. Serv. 13,
83 - 89 (1955)

HARGROVE, R. E., McDONOUGH, F. E. u. REAMER, R. H.

A selective medium and presumptive procedure for detection of salmonella in dairy products

J. Milk Food Technol. 34, 6 - 12 (1971)

HARMON, S. M. u. KAUTTER, D. A.

Comparison of stomacher und Waring blender for homogenizing foods to be examined for Clostridium perfringens

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 1007 - 1010 (1979)

HARMON, S., KAUTTER, D. u. PEELER, J.

Improved medium for enumeration of Clostridium perfringens

Appl. Microbiol. 22, 688 - 692 (1971)

HARVEY, R. W. S. u. THOMSON, S.

Optimum temperature of incubation for isolation of salmonella

Month. Bull. Minist. Health Public Health Lab. Serv. 12, 149 - 150 (1953)

HARVEY, R. W. S. u. PRICE, T. H.

Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of salmonellas from heavily contaminated materials

J. Hyg. Camb. 66, 377 - 381 (1968)

dies. Principles of salmonella isolation. A review

J. appl. Bact. 46, 27 - 56 (1979)

HENNER, S.

Pers. Mitteilung (1980)

HIBBERT, H. R. u. SPENCER, R.

An investigation of the inhibitory properties of sodium thioglycollate in media for the recovery of clostridial spores

J. Hyg., Camb. 68, 131 - 135 (1970)

HILDEBRANDT, G. u. KATSARAS, K.

Vorkommen und Identifizierung von *Clostridium perfringens*
in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Fleischwirtschaft 61, 115 - 123 (1981)

HOBRECHT, R.

Isolierung und Identifizierung von Gasödemerregeren aus
Gewebsproben

Wehrmed. Mschr. 19, 1 - 4 (1975)

ders. Pers. Mitteilung (1981)

HOPPE, P.-P.

Untersuchungen über das Vorkommen von *Clostridium perfringens*
in Fäzes, Blut, Leber, Milz, Muskulatur und Lymphknoten normal-
und notgeschlachteter sowie verendeter Schweine

Vet. Med. Diss., FU Berlin (1979)

INAL, T. u. LEISTNER, L.

Anaerobenzüchtung in Vakuum-Inertgas-Brutschränken

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 109 - 111 (1969)

IVESON, J. B. u. MACKAY-SCOLLAY, E. M.

Strontium chloride and strontium selenite enrichment broth
media in the isolation of salmonella

J. Hyg. Camb. 67, 457 - 464 (1969)

JUNG, E. und SCHALLEHN, G.

Vorkommen und Verbreitung von Gasödemerregeren

Zbl. Bakt. I Ref. 254, 1 - 54 (1977)

KAFEL, S. u. BRYAN, F. L.

Effects of enrichment media and incubation conditions on
isolating salmonellae from ground-meat filtrate

Appl. Environ. Microbiol. 34, 285 - 291 (1977)

KATSARAS, K. u. HILDEBRANDT, G.

Ursachen bakterieller Lebensmittelvergiftungen: Enterotoxin
von Clostridium perfringens Typ A
Fleischwirtschaft 59, 954 - 958 (1979)

KAUFFMANN, F.

Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus- und
Paratyphusbazillen
Zbl. Bakt. I Orig. 119, 148 - 152 (1930)

ders. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsver-
fahren für Salmonella-Bazillen
Zschrft. Hyg. Infektionskr. 117, 26 - 32 (1935)

KELCH, F.

Über den Nachweis anaerober Bazillen in einem flüssigen
Nährsubstrat
Arch. Lebensmittelhyg. 6, 263 - 265 (1955)

KELTERBORN, E.

Pers. Mitteilung (1981)

KERSCHNER, K.

Ein Beitrag über das Vorkommen von Salmonellen auf der Ober-
fläche frischer Schweine-Innereien (Herz, Leber, Niere) unter
Berücksichtigung der verschiedenen Herkunft und Vermarktungs-
stufen
Vet. Med. Diss., FU Berlin (1980)

KRAUS, H.

Neuzeitliche diagnostische Laboratoriumsverfahren unter beson-
derer Berücksichtigung des Clostridiennachweises im Rahmen der
bakteriologischen Fleischuntersuchung
Schlacht-Viehhof-Ztg. 62, 357 - 359 (1962)

KLEIN, H. u. DITGENS, K.

Zur Beurteilung des unspezifischen Keimgehaltes der Muskelproben bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Tierärztl. Umsch. 21, 505 - 514 (1966)

KLEIN, H. u. HÖRTER, R.

Untersuchungen zur Beurteilung des unspezifischen Keimgehaltes der Muskelproben bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 184 - 187 (1973)

KLIMA, H.

Über einen Milzbrandfall anlässlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 12 - 14 (1972)

LEIFSON, E.

New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (salmonella) bacilli

Am.J. Hyg. 24, 423 - 432 (1936)

LEISTNER, L.

Vorkommen und Bedeutung von Clostridien in Fleischkonserven

Arch. Lebensmittelhyg. 21, 145 - 148 (1970)

LEVETZOW, R.

Ein Beitrag zum Clostridiennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 217 - 219 (1967)

ders.

Über die Notwendigkeit, den Nachweis von Clostridien im Rahmen der BU neu zu regeln

Schlacht-Viehhof-Ztg. 69, 264 - 265 (1969)

- ders. Clostridien in Lebensmitteln unter besonderer Berücksichtigung der Bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)
Arch. Lebensmittelhyg. 22, 213 - 220 (1971)
- ders. Pers. Mitteilung (1982)
- LOTT, G.

Die bakteriellen Lebensmittelvergiftungen
Sondernummer Alimenta, 27 - 33 (1970)
- MANSSON, I. u. OLHAGEN, B.

Intestinal Clostridium perfringens in arthritis und para-keratosis induced by dietary factors. Experimental studies in pigs
Bull. Off. int. Epizoot. 67, 1319 - 1328 (1967)
- MARSHALL, R., STEENBERGEN, J. u. McCCLUNG, L.

Rapid technique for the enumeration of Clostridium perfringens
Appl. Microbiol. 13, 559 - 563 (1965)
- MARX, H.

Ein modifiziertes Verfahren zur Entnahme von Gallenflüssigkeit für die amtliche bakteriologische Fleischuntersuchung (BU)
Arch. Lebensmittelhyg. 27, 60 - 63 (1976)
- MARX, M. u. REUTER, G.

Erhebungen über Häufigkeit und Bewertung des sogenannten unspezifischen Keimgehaltes bei der amtlichen Bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)
Arch. Lebensmittelhyg. 25, 49 - 53 (1974 a)
- dies. Zur Problematik des "unspezifischen Keimgehaltes" im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)
Schlacht-Viehhof-Ztg. 74, 291 - 294 (1974 b)

dies. Überprüfung der Methodik zur bakteriologischen Untersuchung von Lymphknoten, durchgeführt an Mandibular-Lymphknoten des Schweines, und Stellungnahme zur Aussagekraft des feststellbaren allgemeinen Keimgehaltes

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 145 - 153 (1976)

MAYER, H. u. VINÇON, H.

Gegenwartsprobleme der Schlachthofhygiene durch Importe von Schlachtschweinen

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 227 - 231 (1974)

McCAUGHEY, W. J., McCLELLAND u. HANNA, J.

Some observations on Salmonella dublin infection in clinically healthy beef cattle

Br. vet. J. 127, 549 - 556 (1971)

MERCK, E.

Handbuch Nährböden MERCK 1985

E. Merck, Darmstadt (1984)

MULINDWA, D. K. u. PIETZSCH, O.

Studies on the influence of the competitive Enterobacteriaceae flora on salmonella isolation

Zbl. Bakt. I Orig. A 243, 336 - 348 (1979)

MULLER, L.

Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques

Comp. Rendus Soc. Biol. 89, 434 - 437 (1923)

NARAYAN, K. G.

Studies on clostridia incidence in the beef cattle

Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 16, 65 - 72 (1966 a)

ders.

Selective agents in cultivation of clostridia

Zbl. Bakt. I Orig. 201, 57 - 64 (1966 b)

ders. Incidence of food poisoning clostridia in meat animals
Zbl. Bakt. I Orig. 204, 265 - 273 (1967 a)

ders. Incidence of clostridia in pigs
Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 17, 179 - 182 (1967 b)

ders. Food borne infection with *Clostridium perfringens* type A
Int. J. Zoonoses 9, 12 - 32 (1982)

NARUCKA, U. u. WESTENDORP, J. F.

The importance of *Corynebacterium pyogenes* in meat inspection
Tijdschr. Diergeneesk. 97, 127 - 138 (1972)

NITSCHIPORUK, W. S.

Befall von Muskulatur und Organen von Schlachttieren mit *Clostridium perfringens*
Veterinarija 44, 94 - 95 (1968)

NORTH, W. R. u. BARTRAM, M. T.

The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of salmonella
Appl. Microbiol. 1, 130 - 134 (1953)

OBIGER, G. u. SCHÖNBERG, A.

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Nährböden zur bakteriologischen Diagnose der Listeriose
Fleischwirtschaft 53, 1452 - 1456 (1973)

OOSTEROM, J., VAN ERNE, E. H. W. u. VAN SCHOTHORST, M.

Epidemiological studies on salmonella in a certain area ("Walcheren project")
V. Studies into the possibility of fattening pigs free from salmonella
Zbl. Bakt I Orig. A 252, 490 - 506 (1982)

OSBORNE, W. W. u. STOKES, J. L.

A modified selenite brilliant green medium for the isolation of salmonella from egg products
Appl. Microbiol. 3, 295 - 299 (1955)

PÄHR, J.

Über den bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung festgestellten Keimgehalt und seine Aussage für den Fleischbeschauerarzt

Tierärztl. Umsch. 18, 172 - 175 (1963)

PETRI, K. u. SCHURIAN, E.

Der Gelenkrotlauf der Schweine, unter besonderer Berücksichtigung der regionalen Lymphknoten

Arch. Lebensmittelhyg. 10, 217 - 219 (1959)

PIETZSCH, O.

Ein Nährboden zur Schwärmhemmung und gleichzeitigen Unterscheidung der Proteuskeime von Salmonellen

Fleischwirtschaft 47, 31 - 32 (1967)

ders. Der Salmonellennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Fleischwirtschaft 54, 194 - 197 (1974)

ders. Standardisierung des Salmonella-Nachweisverfahrens bei Lebensmitteluntersuchungen

Bundesgesundhbl. 19, 148 - 149 (1976)

ders. Salmonella

In: (BLOBEL, H. u. SCHLIESSER, T., Hrsg.)
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. III,
S. 344 - 452

G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1981)

ders. Pers. Mitteilung (1982)

ders. Pers. Mitteilung (1984)

PIETZSCH, O. u. KAWERAU, H.

Salmonellen in Schweine-Schlacht- und -Zerlegebetrieben sowie Schweinehackfleisch

Vet. Med. Hefte 1

Inst. Vet. Med. des Bundesgesundheitsamtes, Berlin (1984)

PIETZSCH, O., KRETSCHMER, F.-J. u. BULLING, E.

Vergleichsuntersuchungen über Salmonella-Anreicherungsverfahren
Zbl. Bakt. I Orig. A 232, 232 - 246 (1975)

PREUSS, H.

Über eine neue Tetrathionat-Anreicherung
Zschrft. Hyg. Infektionskr. 129, 187 - 214 (1949)

QUAGLIARD, D. A.

An improved cooked meat medium for the detection of Clostridium
botulinum
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 563 - 569 (1977)

RAPPAPORT, F., KONFORTI, N. u. NAVON, B.

A new enrichment medium for certain salmonellae
J. Clin. Pathol. 9, 261 - 266 (1956)

RING, CH., REUTER, G. u. GROSSKLAUS, D.

Absichten der EG zur Fleischhygiene
Proceed. 25. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittel-
hygiene der Deutschen Vet.-med. Ges., S. 262 - 266
Garmisch-Partenkirchen, 18. - 21. 9. 1984

REUSSE, U.

Nachweismethoden von Salmonellen und Enterobacteriaceen
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 138 - 145 (1978)

ders. Pers. Mitteilung (1982)

REUSSE, U., HAFKE, A. u. MEYER, A.

Erfahrungen bei der Isolierung von Salmonellen und Entero-
bacteriaceen
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 137 - 143 (1975)

REUTER, G.

Pers. Mitteilung (1980)

- ders. Vorschlag der Arbeitsgruppe Mikrobiologische Fleischunter-
suchung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft für eine Neufassung der
Methodik der Bakteriologischen Fleischuntersuchung nach Anlage 1
zu § 20 AB.A (1983)
- ders. Die Problematik mikrobiologischer Normen bei Fleisch
Arch. Lebensmittelhyg. 35, 106 - 109 (1984)
- REUTER, G., MARX, M. u. WACHELAU, G.
- Ein Gerät für die kontaminationsfreie Gewinnung und Aufberei-
tung von Probenmaterial für die bakteriologische Untersuchung
und die Untersuchung auf Hemmstoffe im Rahmen der amtlichen
Fleischuntersuchung
Fleischwirtschaft 57, 1169 - 1174 (1977)
- SAGAJEWSKIJ, I. S.
- Befall von Rindfleisch mit *Clostridium perfringens*
Veterinarija 49, 101 - 103 (1973)
- SAUER, B. u. BERG, H. H.
- Eine einfache Kühlmethode zum Versand von BU- und Rückstandspro-
ben
Schlacht-Viehhof-Ztg. 74, 266 - 267 (1974)
- SCHIEHMANN, D. A.
- Evaluation of the stomacher for preparation of food homogenates
J. Food Protect. 40, 445 - 448 (1977)
- SCHÖNE, W.
- Über die Grenzen und Möglichkeiten der bakteriologischen Fleisch-
untersuchung
Arch. Lebensmittelhyg. 16, 269 - 273 (1965)
- SCHOOP, G.
- Clostridien der Haustiere
In: (BLOBEL, H. u. SCHLIESSER, T., Hrgg.)
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II,
S. 555 - 666
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1980)

SCHULER, A.

Materialentnahme für die bakteriologische Fleischuntersuchung
Fleischwirtschaft 54, 1040 - 1041 (1974)

ders.

Auswertung einer neuen Entnahmetechnik für die bakteriologische
Fleischuntersuchung
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 121, 311 - 321 (1979)

SEIDEL, G.

Übersicht über das Ergebnis einer Umfrage über Probleme der
bakteriologischen Fleischuntersuchung
Schlacht-Viehhof-Ztg. 66, 283 - 287 (1966)

SEIDEL, G. u. KIND, H.

Zu Fragen des allgemeinen Keimgehaltes bei der bakteriologischen
Fleischuntersuchung
Monatsh. Vet.Med. 20, 108 - 112 (1965)

SHAHIDI, S. u. FERGUSON, A.

New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid
analysis of food for *Clostridium perfringens*
Appl. Microbiol. 21, 500 - 506 (1971)

SONNENSCHIN, B.

Clostridium botulinum

In: (BLOBEL, H. u. SCHLIESSER, T., Hrsg.)
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II
S. 691 - 745
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1980)

SHARPE, A. N. u. HARSHMAN, G. C.

Recovery of *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and
molds from foods by the stomach: effect of fat content, sur-
factant concentration, and blending time
Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 9, 30 - 34 (1976)

SHARPE, A. N. u. JACKSON, A. K.

Stomaching: a new concept in bacteriological sample preparation
Appl. Microbiol. 24, 175 - 178 (1972)

SINELL, H.-J. u. LEVETZOW, R.

Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Clostridien in Lebens-
mitteln
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 73 - 74 (1967)

SINELL, H.-J. u. KOLB, H.

Lebensmittelvergiftungen in der Bundesrepublik Deutschland im
Spiegel der Literatur
Fleischwirtschaft 61, 572 - 577 (1981)

SINHA, M., WILLINGER, H. u. TRČKA^V, J.

Untersuchungen über das Auftreten von Clostridium perfringens
bei Haustieren (Pferde, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen und
Hühner)
Wien. tierärztl. Mschr., 62, 163 - 169 (1975)

SKJELKVÅLE, R., STRINGER, M. F. u. SMART, J. L.

Enterotoxin production by lecithinase-positive and lecithinase-
negative Clostridium perfringens isolated from food poisoning
outbreaks and other sources
J. appl. Bact. 47, 329 - 339 (1979)

SMART, J. L., ROBERTS, T. A., STRINGER, M. F. u. SHAH, N.

The incidence and serotypes of Clostridium perfringens on beef,
pork and lamb carcasses
J. appl. Bact. 46, 377 - 383 (1979)

SMITH, L. DS. u. HOBBS, G.

Clostridium

In: (BUCHANAN, R. E. u. GIBBONS, N. E., Eds.)
BERGEY'S manual of determinative bacteriology, pp 551 - 572
The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)

SNIJDEERS, J. M. A., GERATS, G. E. u. VAN LOGTESTIJN, J. G.

Good manufacturing practices during slaughtering
Arch. Lebensmittelhyg. 35, 99 - 103 (1984)

STOKES, J. L. u. OSBORNE, W. W.

A selenite brilliant green medium for the isolation of
salmonella
Appl. Microbiol. 3, 217 - 220 (1955)

STENGEL, G.

Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica*
Vet.Med. Diss., FU Berlin (1983)

STOLLE, A.

Spreading of salmonellas during cattle slaughtering
J. appl. Bact. 50, 239 - 245 (1981)

STOLLE, A. u. REUTER, G.

Prüfung der Möglichkeiten zur Vorverlegung der Schlachttier-
untersuchung in die Herkunftsbestände bei Schweinen
Schlacht-Viehhof-Ztg. 74, 87 - 91 (1974)

dies. Die Nachweisbarkeit von Salmonellen bei klinisch gesunden
Schlachtrindern im Bestand, nach dem Transport zum Schlacht-
hof und während des Schlachtprozesses
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 188 - 193 (1978 a)

dies. Untersuchungen über die Aussagekraft einer vorverlegten
Schlachttieruntersuchung in Rinderbeständen
Fleischwirtschaft 58, 641 - 642, 645 - 647 (1978 b)

dies. Die Amtliche Bakteriologische Fleischuntersuchung (BU) in
der Bundesrepublik Deutschland und in 14 Europäischen Ländern
Schlachten u. Vermarkten 80, 175 - 182 (1980 a)

dies. Hygienische Risikostufen beim halbautomatischen Rinderschlacht-
prozeß
Schlachten u. Vermarkten 80, 370 - 374 (1980 b)

TAKACS, J.

Comparative examinations for the effectiveness of media to detect clostridia from canned meat products

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 101 - 104 (1971)

TOEPFER, H.

Praxisnahe Betrachtung der Vorschriften über die bakteriologische Fleischuntersuchung unter besonderer Berücksichtigung der Bewertung des Keimgehaltes

Schlacht-Viehhof-Ztg. 73, 297 - 302 (1973)

TUTTLEBEE, J. W.

The stomacher - its use for homogenization in food microbiology

J. Food Technol. 10, 113 - 122 (1975)

UNTERMANN, F.

Einfluß verschiedener Verdünnungstechniken auf die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 254 - 258 (1967)

VAN SCHOTHORST, M., VAN LEUSDEN, F. M., JEUNINK, J. und DE DREU, J.

Studies on the multiplication of salmonellae in various enrichment media at different incubation temperatures

J. appl. Bact. 42, 157 - 163 (1977)

VASSILIADIS, P., PATERAKI, E. PAPADAKIS, J. u. TRICHOPOULOS, D.

Evaluation of the growth of salmonellae in Rappaport's broth and in Muller-Kauffmann's tetrathionate broth

J. appl. Bact. 37, 411 - 418 (1974)

VASSILIADIS, P., TRICHOPOULOS, D., PAPADAKIS, J., KALAPOTHAKI, V., ZAVITSANOS, X., u. SERIE, CH.

Salmonella isolation with Rappaport's enrichment medium of different compositions

Zbl. Bakt. I Orig. B 173, 382 - 389 (1981)

WEHRSPANN, P.

Ein Vergleich verschiedener Anaerobier-Züchtungsverfahren mit besonderer Berücksichtigung des GASPAC-Systems

Zbl. Bakt. I Orig. A 234, 121 - 128 (1976)

WEISSER, W.

Streptokokkenisolierungen aus Organen von not- und krankgeschlachteten Rindern und Kälbern im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)

Arch. Lebensmittelhyg. 30, 186 - 192 (1979)

ders.

Streptokokkenisolierungen aus Organen von not- und krankgeschlachteten Schweinen im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 134 - 138 (1980)

WEISSER, W. u. KÖHLER, J.

Kulturelle Untersuchungen von Schlachtschweine-Lymphknoten auf das Vorkommen von beta-hämolysierenden Streptokokken

Tierärztl. Umsch. 37, 338 - 344 (1982)

WILLIS, A. T.

Techniques for the study of anaerobic, spore-forming bacteria

In: (NORRIS, J. R. u. RIBBONS, D. W., Eds.)

Methods in microbiology, Vol. 38, pp. 79 - 116

Academic Press, New York, London (1970)

WILLIS, A. T. u. HOBBS, G.

Some new media for the isolation and identification of clostridia

J. Path. Bact. 77, 511 - 521 (1959)

WILSON, W. J. u. BLAIR, E. M.

The application of a sulphite glucose iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies

J. Path. Bact. 27, 119 - 121 (1924)

ZIMMERMANN, G.

Zur Untersuchung und Beurteilung rotlaufkranker und -verdächtiger Schlachtschweine

Tierärztl. Umsch. 18, 114 - 119 (1963)

N.N.

Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis von Salmonellen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Referenzverfahren L 06.00/11

In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMGG
Beuth Verlag, Berlin, Köln (1980)

A N H A N G

Tab. 18: Übersicht über die 5 Einzelnachweise von Salmonellen aus 219 BU-Einsendungen (Serie 1). Verteilung auf Probenaufbereitungs- und Anreicherungsmodifikationen sowie feste Selektivnährböden

	Modifiziertes Verfahren				bisherige amtl. Methode			
	Homogenisat				Stückproben			
Probenaufbereitung	M 2 + Mi + Ni + Le				M+Ln+Mi+Ni	Le+Leln+Ga		
Anreicherungstyp	Selenit-Cystin 37° C		MULLER-KAUFFM. 43° C		PREUSS 37° C	PREUSS 37° C		
feste Nährböden	BPLS	XLD	BPLS	XLD	BPL	ENDO	BPL	ENDO
S. dublin (Rind)	+	+						
S. bovis morbificans (Schwein)	+	+	+	+		+		+
S. bovis morbificans (Rind)					+	+		
S. infantis (Kalb)	+	+						
S. infantis (Rind)	+	+	+	+	+	+		

M 1/2 = Muskulatur Vorder- bzw. Hinterviertel
 Ln 1/2 = Lymphknoten Vorder- bzw. Hinterviertel
 Mi = Milz
 Ni = Niere
 Le = Leber
 Leln = Leberlymphknoten
 Ga = Galle

BPLS = Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
 XLD = Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
 BPL = Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar
 ENDO = ENDO-Agar

Tab. 19: Übersicht über die Einzelnachweise von Salmonellen aus 40 vorselektierten, z. T. bereits als salmonellenhaltig bekannten BU-Einsendungen von Rindern (Serie 2). Verteilung auf Probenaufbereitungs- und Anreicherungsmodifikationen sowie feste Selektivnährböden

Probenaufbereitung	Modifiziertes Verfahren				bisherige amtl. Methode			
	Homogenisat				Stückproben			
	M 2 + Mi + Ni + Le				M+L+Mi+Ni		Le+Leln+Ga	
Anreicherungstyp	Selenit-Cystin 37° C		MULLER-KAUFFM. 43° C		PREUSS 37° C		PREUSS 37° C	
feste Nährböden	BPLS	XLD	BPLS	XLD	BPL	ENDO	BPL	ENDO
<i>S. typhi-murium</i>			+	+				
<i>S. typhi-murium</i>					+	+	+	+
<i>S. typhi-murium</i>	+	+	+	+			+	+
<i>S. derby var.</i>			+	+				
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+				
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+		+	+	+
<i>S. typhi-murium</i>							+	+
<i>S. infantis</i>								+
<i>S. enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+	+			
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+	+			
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+				
<i>S. infantis</i>			+	+		+	+	+
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+				
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+		+		
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+			+	+
<i>S. infantis</i>								+
<i>S. infantis</i>							+	+
<i>S. typhi-murium</i>	+	+		+	+	+	+	+

Tab.20: Übersicht über Einzelnachweise von Salmonellen aus 24 vorselektierten, bereits als salmonellenhaltig bekannten BU-Einsendungen in 2 Anreicherungsmodifikationen A und B mit zusätzlicher Differenzierung zwischen Oberflächen- und Tiefenproben (Serie 3)

Anreicherungsmodifikation	A								B	
Art der Probe	Tiefenproben				Oberflächenproben				Tiefenproben	
Beschaffenheit der Probe	Homo-genisat		Stückproben		Homo-genisat		Stückproben		Stückproben	
Anreicherungsmedium	37 ^o SC	43 ^o MK	37 ^o SC	43 ^o MK	37 ^o SC	43 ^o MK	37 ^o SC	43 ^o MK	37 ^o SC	43 ^o MK
feste Nährböden	B X	B X	B X	B X	B X	B X	B X	B X	B X	B X
Salmonella										
S. dublin Rd.	+	+	+	+	+		+			
S. typhi-murium Rd.						+		+		+
S. infantis Rd.		+	+	+		+		+	+	+
S. derby var. Rd.					+	+	+	+	+	+
S. typhi-murium Schw.						+		+		
S. dublin Rd.					+	+			+	+
S. agona Rd.		+							+	+
S. dublin Rd.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. typhi-murium Rd.	+	+	+	+	+		+	+	+	+
S. typhi-murium Schw.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. typhi-murium Rd.			+	+		+	+	+	+	+
S. typhi-murium Rd.							+	+	+	+
S. infantis Schw.									+	+
S. typhi-murium Rd.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. ty.-mur. var.cop.Rd.					+	+			+	+
S. typhi-murium Rd.	+		+	+	+	+	+	+	+	+
S. typhi-murium Rd.	+			+	+	+	+	+	+	+
S. typhi-murium Rd.					+	+		+		+
S. agona Rd.		+		+		+				+
S. typhi-murium Rd.							+	+		+
S. typhi-murium Rd.						+		+		+
S. java Rd.	+	+				+	+	+	+	+

A = Muskulatur + Milz + Niere + Leber

B = Leber + Leberlymphknoten + Galle

Rd. = Rind

Schw. = Schwein

SC = Selenit-Cystin-Anreicherung

MK = Tetrathionatanreicherung
nach MÜLLER-KAUFFMANN

B = Brillantgrün-Phenolrot-
Laktose-Saccharose-Agar

X = Xylose-Lysin-Desoxycholat-
Agar

Tab. 21: Verteilung von 452 Salmonellenisolaten aus 61.219 Einsendungen an die BU-Stelle am Schlachthof Nürnberg auf Serotypen und Tierarten (Zeitraum 1977 - 1982)

Serotyp	Rind	Kalb	Schwein	Pferd	Schaf	Gesamtzahl
S. typhi-murium einschl. Variante	104 41,4 %	20 24,7 %	39 33,1 %	-	-	163 36,1 %
S. infantis	41 16,3 %	15 18,5 %	2 1,7 %	-	1	59 13,1 %
S. enteritidis	23 9,2 %	26 32,1 %	3 2,5 %	-	-	52 11,5 %
S. london	21 8,4 %	2 2,5 %	18 15,3 %	-	-	41 9,1 %
S. derby einschl. Variante	6 2,4 %	1 1,2 %	17 14,4 %	-	-	24 5,3 %
S. panama	4 1,6 %	1 1,2 %	12 10,2 %	-	-	17 3,8 %
S. dublin	6 2,4 %	9 11,1 %	-	-	-	15 3,3 %
Σ	205	74	91	-	1	358 79,2 %

○ = gehäuftes Auftreten

Fortsetzung der Tab. 21:

Serotyp	Rind	Kalb	Schwein	Pferd	Schaf	Gesamt- zahl
	205	74	91	-	1	358 79,2 %
S. abortus-bovis	5	-	-	-	-	5
S. abortus-equi	-	-	-	1	-	1
S. agona	2	1	1	-	-	4
S. amsterdam	1	-	-	-	-	1
S. blockley	1	-	-	-	-	1
S. bovis moribific.	3	-	-	-	-	3
S. braenderup	2	-	-	-	-	2
S. brandenburg	3	-	1	-	-	4
S. bredeney	2	-	2	-	-	4
S. drypool	-	1	-	-	-	1
S. falkensee	-	-	1	-	-	1
S. give	3	1	6	-	-	10
S. heidelberg (var.)	3 (1)	-	4	-	-	8
S. indiana	-	-	1	-	-	1
S. livingstone	3	1	2	-	-	6
S. montevideo	1	-	1	-	-	2
S. münchen	2	-	-	-	-	2
S. newlands	3	-	-	-	-	3
S. newport	1	-	-	-	-	1
S. brandenburg	2	-	-	-	-	2
S. parow	-	-	1	-	-	1
S. saint-paul	2	-	-	-	-	2
S. tennessee	1	-	-	-	-	1
S. schleißheim	1	-	1	-	-	2
S. sinstorf	1	-	-	-	-	1
S. stanley	-	2	1	-	-	3
S. thompson	1	-	3	-	-	4
S. typhi-suis	-	-	2	-	-	2
S. westhampton	1	-	-	-	-	1
S. worthington	1	1	-	-	-	2
Σ	251	81	118	1	1	452

An dieser Stelle sei all denen gedankt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Reuter, danke ich vielfach für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Anregungen und seinen jederzeit freundlich gewährten Rat.

Herrn Ltd. Vet.Dir. Dr. Frieß, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Nürnberg, sei für die Anregung zu dieser Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und die Zurverfügungstellung der Arbeitsmöglichkeiten herzlich gedankt.

Stets wertvolle und hilfreiche Anregungen und Ratschläge zur Durchführung der Arbeit sowie statistische Daten aus der Zentralstelle für veterinärmedizinische Salmonelloseforschung am Bundesgesundheitsamt Berlin erhielt ich dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Pietzsch.

Bei der Abklärung statistischer Fragen war Herr Prof. Weiß, Fachrichtung Biometrie, behilflich, auch ihm gilt mein Dank.

Die Durchführung dieser Arbeit war nur möglich, da mir die BU-Stellen an den Schlachthöfen Nürnberg und Schweinfurt Probenmaterial zur Verfügung stellten und erstere Einblicke in die Untersuchungsprotokolle aus zurückliegenden Jahren gewährten. Dafür danke ich den Herren Ltd. Vet.Dir. Dr. Bethcke und Vet. Dir. Dr. Berg (Nürnberg) und Herrn Vet.Dir. Dr. Neubert (Schweinfurt) recht herzlich.

Allen Mitarbeitern der Abteilungen II und III des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Nordbayern in Nürnberg, die mir ihre Hilfe und Unterstützung zuteil werden ließen, bin ich zu großem Dank verpflichtet, insbesondere Herrn Vet. Dir. Dr. Burow für die ausführlichen, hilfreichen Diskussionen bei der Planung und Durchführung der Arbeit und Frau Vet.Rätin Wachowitz für ihre Unterstützung bei der Identifizierung von Salmonellen und Clostridien.

Lebenslauf

16.12.1951 geboren in Holzheim (jetzt Neumarkt/Opf.) als Sohn des Verwaltungsamtsrats Jakob Bogner und seiner Ehefrau Olga, geb. Hammelmann

1957 - 1962 Besuch der Volksschule in Beilngries/Obb. und Parsberg/Opf.

WS 1971/72 - SS 1974 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Sept. 1974 - Sept. 1975 DAAD-Stipendium zum Studium an der University of Stirling/Schottland. Erlangung des akademischen Grades eines "Master auf Science" in "Aquatic Veterinary Studies"

WS 1975/76 - WS 1977/78 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

11.04.1978 Approbation als Tierarzt

1978/79 Praxistätigkeit

01.02.1980 Anstellung als Tierarzt am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Nürnberg

Lebenslauf

geboren in Berlin (Jahr unbekannt) als Sohn
des Herrnhuterpredigers Johann Gottlieb und seiner
Eltern Frau, geb. Himmelsberg

17. 10. 1751

Besuch der Volksschule in Berlin. Von 1761
bis 1764

1761 - 1764

Studium der Theologie an der Ludwig-Wilhelms-
Universität in Göttingen

1764 - 1770
1770 - 1771

1770-1771 Studium am Seminar in der Provinz
Göttingen. Erlangung des akademischen
Ranks eines "Magister der Theologie" in Göttingen
unter der Leitung

1771 - 1772
1772 - 1773

Studium der Theologie an der Ludwig-Wilhelms-
Universität in Göttingen

1773 - 1775
1775 - 1776

Abschluss als Theolog

1776 - 1778

Pfarrer in Göttingen

1778 - 1780

Abschluss des Theolog in der Provinz
für den Herrnhuter Prediger in Göttingen

1780 - 1781

